

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS FELIPE ZAZULA

ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO
DA PROLE DE RATAS SUPLEMENTADAS COM DOSES SUPRARRECOMENDADAS
DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGAS 3 E 6

CURITIBA

2021

MATHEUS FELIPE ZAZULA

ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO
DA PROLE DE RATAS SUPLEMENTADAS COM DOSES SUPRARRECOMENDADAS
DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGAS 3 E 6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Katya Naliwaiko.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Tereza Bittencourt Guimarães.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Zazula, Matheus Felipe.

Alterações no desenvolvimento do músculo estriado esquelético da prole de ratas suplementadas com doses suprarrecomendadas de ácidos graxos polinsaturados ômega 3 e 6. / Matheus Felipe Zazula. – Curitiba, 2021.
139 f. : il.

Orientadora: Katya Naliwaiko.

Coorientadora: Ana Tereza Bittencourt Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Metabolismo energético. 2. Oxigênio. 3. Músculos. I. Título. II. Naliwaiko, Katya. III. Guimarães, Ana Tereza Bittencourt. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 611.73



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATHEUS FELIPE ZAZULA** intitulada: **ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DA PROLE DE RATAS SUPLEMENTADAS COM DOSES SUPRARRECOMENDADAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGAS 3 E 6**, sob orientação da Profa. Dra. KATYA NALIWAIKO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/04/2021 14:57:28.0

KATYA NALIWAIKO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/05/2021 10:35:57.0

LUCIA ELVIRA ALVARES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

30/04/2021 17:34:49.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 90329

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 90329

Я присвячую цю роботу всім, хто був зі мною у цій подорожі, моїй родині, моїм бабусям і дідусям та моїм братам, друзям та професійним партнерам!

Я присвячую цю роботу всім людям, які борються за кращий світ, через знання та повагу до всіх форм життя!

Нарешті, я присвячую цю роботу особливо тій, яку обрало моє серце!

Я всіх вас люблю і дякую!

AGRADECIMENTO

Agradeço incansavelmente à minha família, meus avós Pedro, Mafalda e Ivone, que sempre fizeram o melhor para nós, desde que nascemos foram a principal fonte de amor e até hoje são o nosso maior exemplo de vida, o nosso maior refúgio, eu amo vocês e não seria metade do que sou se não fosse por vocês! A minha maior motivação é encher vocês de orgulho sempre!

Aos meus pais, Vanderlei e Igeani, que por mais que tivemos uma história conturbada, hoje já adulto tenho um carinho muito grande por vocês, obrigado por terem me dado a vida e meus maiores presentes, o João e a Maria. Ermãos, ou pudins de cachaça, ou “tua mãe de achou na lixeira!”, ou tantos outros apelidos carinhosos que nem dá pra escrever aqui, eu não sei o que seria sem vocês dois! Não me lembro de muitos momentos em que vocês não estivessem ao meu lado, obrigado por serem a melhor parte da minha vida. E principalmente, agradeço muito o apoio de vocês, coisas do tipo “*ai para de falar, você sabe que a gente não tá entendendo*” ou “*vai dormir pia, é domingo*”. Eu amo muito vocês, pode não parecer as vezes, mas vocês são meus melhores amigos, desde sempre e para sempre. A Letícia, minha prima querida (só que nem sempre hahaha), que é minha irmã de outra mãe (que inclusive é muito mais que minha mãe), obrigado por ter sido o presente que a Tia Diana trouxe pra gente. Aos agregados que já nem sei separar da minha vida, Renata e Luiz, obrigado por dividirem tantos momentos bons comigo e principalmente por cuidarem dos meus irmãos. Aos meus amigos do Sonhachnek e do Barvinok (é muita gente desculpa), vocês são minha família, amo vocês. Aos que estiveram do meu lado desde que cheguei em Curitiba, Felipe e Dani, Raquel e Luiz, Dani Danielak (que inclusive tava comigo no dia da prova pra entrar nessa bagaça haha) obrigado por tudo e por não desistirem desse viciado em trabalhar. Também agradeço muito ao Bruno, que aguentou uma barra comigo no começo do mestrado.

À todas as pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida, que estiveram ao meu lado em momentos importantes, muito obrigado por acreditarem em mim. Por fim, a todas as pessoas que já se foram, mas torciam pela minha felicidade, obrigado por terem feito parte da minha vida e sinto muita falta de vocês, onde quer que estejam espero estar dando muito orgulho para vocês, Вічна їх Пам’ять.

À UNIOESTE, ou “Universidadezinha do Interior” (tsc tsc tsc) pros mais chegados, também à UFPR, por terem me aberto tantas portas, meu eterno agradecimento por ter me dado a profissão mais linda desse mundo (todo mundo deveria ser biólogo hehe). Aos meus professores, são muitos desde que comecei nessa caminhada, mas todos foram fundamentais para que eu chegasse até a Universidade e agora ao fim do mestrado, obrigado por sempre acreditarem em mim (e principalmente aturarem minha tagarelice). Agradeço também as

professoras Lúcia e Fernanda por terem aceitado prontamente o convite para participarem da defesa, obrigado pela disponibilidade. Agradeço também ao CNPq pela bolsa e os demais recursos, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço incansavelmente ela, a pessoa que me joga pra fora da zona de conforto num dia sim e no outro mais duas vezes. Que me viu zanzando em dúvida pela UNIOESTE e falou na minha cara: “*se continuar aqui eu nunca mais olho na sua cara*”, e fez mais, veio pra Curitiba e me jogou pra outra professora hahahaha. Ana Tereza, sem sombra de dúvidas você sempre foi uma pessoa extremamente importante na minha formação, tenho maior carinho em te chamar de mãe científica. Você é um raio de luz e alegria na vida de tanta gente, obrigado por ser incrível assim (e me ensinar como mandar alguém à merda de uma forma diferente todos os dias hehehe). Eu te amo muito, você é minha inspiração!

Também tem ela, que recebeu uma louca na porta (bjs Ana kkkkkkk) e prontamente aceitou me orientar, sem me conhecer, pegando um moleque que morava do outro lado do estado como aluno. Carinhosamente chamada de chefe, estagiária nova, PVA, IC ou como ela mesmo se denomina “A RM” hahahaha. Katya, muito obrigado por ter me recebido de braços abertos, ter confiado tanto em mim, ter me dado toda a liberdade do mundo durante esses dois anos. Eu morria de medo de sair de casa e ir pra outra cidade e me dar mal no laboratório novo, mas sem sombras de dúvidas ganhei mais uma mãe científica, uma grande amiga (e uma cacetada de apelidos novos kkkkkk). Amo tu RM, e se lascou pra me aguentar mais um time.

Agradeço também ao chefe, Luiz Cláudio, por ter me recebido tão bem, ceder prontamente o espaço e os materiais e ter confiado em mim. É muito bom ter você pra poder contar sempre que tenho dúvidas ou ideias novas. Obrigado por estar sempre disponível e pelos melhores comentários que sempre me fazem rir hahaha. Tenho muito a agradecer também a Lucélia, pelas maiores e mais importantes broncas e conselhos, desde o primeiro dia de aula hahahaha. Lu, sou imensamente grato por todos os momentos, risadas e pela sua amizade, é muito bom ter pessoas assim como você por perto. Inclusive, obrigado por ter ajudado a Ana a me jogar pra Katya!

Também agradeço as professoras Fabíola e Márcia (também conhecida como termômetro de besteira que eu solto), por estarem sempre prontas para ajudar a gente no laboratório, dar conselhos, ensinar alguma mandinga que faz tudo dar certo. Sinto muita falta de conviver diariamente com vocês, obrigado por terem me acolhido tão bem desde sempre! Também agradeço a professora Lia por ter contribuído com esse trabalho desde o projeto, juntamente com a Lucélia. Agradeço a professora Ednéia por ter me recebido tão bem e ter me ensinado a preparar o material pra biomol, logo logo eu chego aí pra continuar o trabalho!

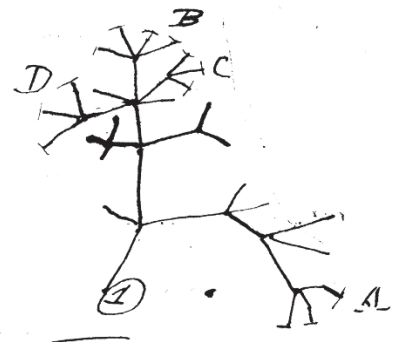
Aos técnicos do departamento de fisiologia, por sempre estarem prontos para atender todos os alunos. Em especial a Debora por ter se tornado minha grande amiga, obrigado pela confiança, por todo o papo e pelos cafés enquanto eu lia minhas infinitas placas hahahaha. As demais colegas do lab metab, obrigado por todos os momentos de trabalho compartilhados.

Ao quarteto das “White Chiks: chaos reign” hahahahahha, Amanda, Suelen, Dai e a mais nova aquisição Rafa (unioeste te teo), e tem a Hersheys!.. Eu nem tenho palavras pra agradecer e expressar todo meu amor e carinho por vocês! Sem sombra de dúvidas vocês foram a força que me fizeram seguir firme até nos momentos mais difíceis. Muito obrigado pelas festinhas, pelos “to de saco cheio, vamo comer?”, pelos “o seu pau d’agua, tamo só conversando e não fizemos porra nenhuma o dia todo”. Enfim, por todos os momentos que passamos juntos. Obrigado, amo vocês demaaaais, são os raios de sol (pega a referência) no meio do pandemônio hahahaha. Saudades de passar o dia todo com vocês!

Agradeço também aos elfos domésticos e “os menino da fisio” por compartilharem tanto tempo de experimento comigo. Shersey (to agradecendo de novo pq tu merece), Victor e Ariane, Lucas, Gabi Tormes, Gabi Bressan, Ana Júlia e Ellen, obrigado por terem feito parte desses dois anos de trabalho, aprendi muito ensinando vocês. Aos meus xodozinhos since 2017, Jãozão, Coral e Diego, é muito bom poder contar com vocês e poder ver vocês crescendo. Aos meus melhores parceiros de laboratório da vidaaaa, Bárbara e Jãozão, eu não sei o que faria sem vocês! Obrigado por serem sensacionais como colegas de profissão e como meus amigos. Guardo vocês dois num lugar mega especial, são meus pontos de apoio. Amo vocês! Aos meus amigos da UNIOESTE, principalmente a Carol (Tetameiro), Jaquinha Rainha, Isa, Ramona, Suellen e Miryan por todos os momentos felizes que tenho perto de vocês. Também tem meus amidos da pós que estão comigo desde o primeiro dia, lutando e chorando (de rir e de ódio) o tempo todo. Tem os cornos (Diego, Anna e Guilherme), Ieda, Annanda, Annanda (mais conhecida como trombeta do apocalipse), Hanna, Roberta, Keila, Rô, Mari, Nay e Adler, obrigado por deixarem esse caminho muito mais fácil e alegre!!

Por último, mas não menos importante (pode ser até o mais hahahahaha), agradeço infinitamente ao maior presente que Curitiba me deu. Ao garoto que chegou do nada e mudou a minha vida, você não tem ideia de como foi importante e me deu força no pior momento desses dois anos. Rubens, você é a pessoa mais doce que eu conheci até hoje, com o coração e o sorriso mais lindo, além de ter as melhores sacadas e senso de humor de nerd hahaha. Eu te amo muito, você me faz ser alguém melhor todos os dias, obrigado por ter chegado de mansinho e trazido tanta paz pra minha bagunça. Admiro muito sua dedicação, paciência e profissionalismo, me inspiro muito em você sempre. Ahhh e feliz aniversário, flw vlw. ❤️

I think



*“That the nature of the relationship, by which
all living and extinct beings are united by
complex, radiating, and circuitous lines of
affinities into one grand system”.*

Charles Darwin, 1859

RESUMO

O desenvolvimento muscular, conhecido como miogênese, é regulado por processos altamente ordenados que podem ser afetados por condições do ambiente. O estado nutricional da progenitora é um fator determinante para os eventos durante o desenvolvimento fetal. Alterações no aporte de nutrientes podem alterar os padrões de obtenção de energia da prole, modificando as preferências metabólicas e podendo levar a desbalanços do sistema antioxidante, que podem atuar negativamente no processo de ativação gênica. Esse estudo visou avaliar o efeito da suplementação com doses elevadas de ácidos graxos sobre o desenvolvimento das proles. Foram utilizadas 30 ratas da linhagem *Wistar*, divididas em 3 grupos experimentais: controle (CTLE), suplementadas antes do acasalamento, durante a gestação e a lactação com 4 g/kg de ômega 3 (SPL3) ou ômega 6 (SPL6). Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi contabilizado e o ganho de peso individual foi mensurado até a data da eutanásia dos animais aos 60 dias de idade. Os órgãos coletados foram pesados e os músculos sóleo (SOL), extensor longo dos dedos (EDL) e plantar (PLAN) foram submetidos a análises bioquímicas e morfológicas. O leite das progenitoras suplementadas apresentou maior aporte lipídico e proteico e peso dos tecidos adiposos do que as CTLE. As proles SPL3 e SPL6 apresentaram maior mortalidade, menor crescimento, e maior índice de Lee quando comparadas às CTLE. A suplementação materna também promoveu aumento do peso dos tecidos adiposos, no peso dos músculos SOL, EDL e PLAN nas respectivas proles. Entretanto, o comprimento dos mesmos músculos foi maior nos animais CTLE em comparação aos SPL3 e SPL6. Notou-se que as proles de mães suplementadas apresentaram o metabolismo energético e o sistema antioxidante alterados nos músculos SOL e EDL, sendo que houve diminuição do metabolismo de carboidratos assim como, aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e aumento da peroxidação lipídica. Tratando-se da morfologia do músculo PLAN, foi possível observar diminuição da presença de fibras do tipo I e aumento das fibras tipo II nos animais SPL3 e SPL6. Ressalta-se, portanto, que o aumento da disponibilidade de lipídios durante o desenvolvimento da prole, interfere na diferenciação das fibras musculares, alterando o padrão de metabolismo muscular, levando a maior geração de espécies reativas de oxigênio, sendo características prejudiciais ao organismo que podem levar a diversas síndromes metabólicas.

Palavras-chave: Miogênese. Metabolismo Energético. Espécies Reativas de Oxigênio.

ABSTRACT

Muscle development, known as myogenesis, is regulated by highly ordered processes that can be affected by environmental conditions. The nutritional status of the mother is a determining factor for events during fetal development. Alterations in the supply of nutrients can alter the patterns of obtaining energy from the offspring, modifying metabolic preferences and may lead to imbalances in the antioxidant system, which can negatively affect the process of gene activation. This study aimed to evaluate the effect of supplementation with high doses of fatty acids on the development of offspring. Thirty female *Wistar* rats were used, divided into 3 experimental groups: control (CTLE), supplemented before mating, during pregnancy, and lactation with 4 g / kg of omega 3 (SPL3) or omega 6 (SPL6). After birth, the number of pups per litter was counted and the individual weight gain was measured until the date of euthanasia of the animals at 60 days of age. The organs collected were weighed and the soleus (SOL), long finger extensor (EDL), and plantar (PLAN) muscles were subjected to biochemical and morphological analysis. The milk of the supplemented parents showed a higher lipid and protein intake and weight of adipose tissues than the FICF. The SPL3 and SPL6 offspring showed higher mortality, less growth, and a higher Lee index when compared to the CTC. Maternal supplementation also promoted an increase in the weight of adipose tissues, in the weight of the SOL, EDL, and PLAN muscles in the respective offspring. However, the length of the same muscles was greater in CTC animals compared to SPL3 and SPL6. It was noted that the offspring of supplemented mothers had an altered energy metabolism and antioxidant system in the SOL and EDL muscles, with a decrease in carbohydrate metabolism as well as an increase in the activity of enzymes in the antioxidant system and an increase in lipid peroxidation. Regarding the morphology of the PLAN muscle, it was possible to observe a decrease in the presence of type I fibers and an increase in type II fibers in animals SPL3 and SPL6. It is noteworthy, therefore, that the increase in the availability of lipids during the development of the offspring, interferes with the differentiation of muscle fibers, altering the pattern of muscle metabolism, leading to a greater generation of reactive oxygen species, being harmful characteristics to the organism that can lead to several metabolic syndromes.

Keywords: Myogenesis. Energy Metabolism. Oxygen-reactive species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da árvore de consenso dos grandes símios das superfamílias Hominoidea (Gray, 1825) (Primates: Simiiformes) e Proconsuloidea (Primates: Simiiformes).	21
Figura 2 - Representação esquemática da composição da Dieta Ocidental e Dieta Mediterrânea	23
Figura 3 - Classificação dos Ácidos Graxos, fórmula e estrutura química geral, estrutura química dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados	25
Figura 4 - Esquema da síntese de Ácidos Graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados	26
Figura 5 - Diferença na capacidade de síntese de AGPIs	30
Figura 6 - Distribuição das $\Delta 12$ e $\Delta 15$ dessaturase em Animalia	31
Figura 7 - Esquema da via de produção de eicosanoides	33
Figura 8 - Esquema dos estágios de desenvolvimento de Eutheria a partir do blastocisto até a placenta madura	35
Figura 9 - Representação esquemática do desenvolvimento embrionário do mesoderma paraxial	38
Figura 10 - Representação geral do desenvolvimento da fibra muscular	39
Figura 11 - Representação esquemática geral do efeito do excesso de nutrientes sobre a via de sinalização WNT	40
Figura 12 - Representação das três categorias evolutivas de organização do tecido muscular	41
Figura 13 - Representação esquemática dos componentes do músculo estriado esquelético: seus envoltórios e compartimentalização; estruturas de vascularização e inervação	42
Figura 14 - Representação esquemática da organização dos sarcômeros nos vertebrados	43
Figura 15 - Representação esquemática dos componentes da célula muscular esquelética	44
Figura 16 - Representação esquemática de uma junção neuromuscular e seus principais constituintes	47
Figura 17 - Representação do metabolismo energético frente os três principais substratos metabólicos celulares, glicose, ácido graxo e aminoácidos	49
Figura 18 - Representação da geração de moléculas oxidantes pela atividade da cadeia transportadora de elétrons	51
Figura 19 - Esquema do delineamento experimental	54

Figura 20 - Ganho de Peso e Consumo alimentar das progenitoras ao longo do período experimental	65
Figura 21 - Dados do dia do nascimento da prole de ratas <i>Wistar</i>	66
Figura 22 - Perfil Bioquímico do Leite Materno	67
Figura 23 - Perfil Bioquímico Plasmático Materno	68
Figura 24 – Variáveis Corporais das Progenitoras	69
Figura 25 - Evolução do Peso Corporal das Ninhadas até o desmame	70
Figura 26 - Características Corporais aos 14 dias	71
Figura 27 - Evolução do Peso Corporal após o desmame	72
Figura 28 - Evolução do Comprimento Nasoanal após o desmame.....	73
Figura 29 - Evolução do Índice de Lee após o desmame	74
Figura 30 - Peso Visceral Padronizado	75
Figura 31 - Variáveis Macroscópicas Musculares.....	76
Figura 32 - Perfil Bioquímico Plasmático	77
Figura 33 - Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos	78
Figura 34 - Metabolismo Energético do Músculo Sóleo.....	79
Figura 35 - Metabolismo Energético do Fígado.....	80
Figura 36 - Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos	81
Figura 37 - Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo	82
Figura 38 - Sistema Antioxidante e Danos Oxidativos do Fígado	83
Figura 39 - Danos Oxidativos e Neurotoxicidade dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico	84
Figura 40 - Fotomicrografia do Músculo Plantar da prole de ratas <i>Wistar</i> aos 60 dias de vida	85
Figura 41 - Características Morfométricas do Músculo Plantar.....	86
Figura 42 - Variáveis Nucleares e Capilarização do Músculo Plantar	87
Figura 43 - Proporção e Área de Secção Transversa por tipo de fibras do Músculo Plantar	88
Figura 44 – Variáveis Corporais da Gestação	89
Figura 45 - Variáveis Corporais ao Desmame	90
Figura 46 – Perfil Bioquímico Plasmático	91
Figura 47 – Perfil Bioquímico do Leite.....	92
Figura 48 - Variáveis do Desenvolvimento	92
Figura 49 – Variáveis Corporais	93

Figura 50 – Perfil Bioquímico Plasmático	94
Figura 51 – Características Mesenquimais	95
Figura 52 – Características Musculares.....	96
Figura 53 – Atividade Bioquímica Hepática	98
Figura 54 - Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos.....	99
Figura 55 - Caracterização dos Tipos de Fibras	100
Figura 56 - Distribuição Capilar e Nuclear	101
Figura 57 - Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Sóleo	101
Figura 58 - Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos	103
Figura 59 – Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Sóleo	103
Figura 60 – Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Extensor Longo dos Dedos....	104
Figura 61 – Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo	105
Figura 62 - Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos.	107
Figura 63 - Esquema do agrupamento dos modelos obtidos pela análise de caminhos	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPIs – Ácidos Graxos Polinsaturados
ALP – Fosfatase Alcalina
ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
CAT – Catalase
CF – Carga Fatorial
CFI - Índice de Ajuste Comparativo
ChE – Colinesterase
CS – Citrato Sintase
CTLE – Controle
CV – Coeficiente de Variação
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
GLDH – Glutamato Desidrogenase
GPx – Glutathione Peroxidase
GST – Glutathione S-Transferase
HK – Hexoquinase
LDH – Lactato Desidrogenase
LPO – Peroxidação Lipídica
MDH – Malato Desidrogenase
NP-SH – Tióis não Proteicos (GSH e outros Tióis)
PCA – Análise de Componentes Principais
PK – Piruvato Quinase
RMSEA - Raiz Quadrada Média do Erro de Aproximação
SOD – Superóxido Dismutase
SPL3 – Suplementados com Ômega-3
SPL6 – Suplementados com Ômega-6
SRMR - Raiz Quadrada Média Residual
TAG – Triacilgliceróis
 ω -3 – Ômega-3
 ω -6 – Ômega-6

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	18
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.2	JUSTIFICATIVA	19
1.3	OBJETIVOS	20
1.3.1	Objetivo Geral	20
1.3.2	Objetivos Específicos	20
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	DIETA E EVOLUÇÃO HUMANA	21
2.1.1	Dietas Ocidentais e Orientais	23
2.2	ÁCIDOS GRAXOS	24
2.2.1	Biodisponibilidade	29
2.2.2	Funções dos Ácidos Graxos em Euarchontoglires	32
2.3	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	34
2.3.1	Nutrição Materna e Programação Metabólica	36
2.4	MIOGÊNESE	36
2.5	TECIDO MUSCULAR	41
2.5.1	Estrutura	42
2.5.2	Metabolismo Energético	47
2.5.3	Sistema Antioxidante	50
2.5.4	Acúmulo Lipídico	52
3.0	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	ANIMAIS	53
3.2	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL	55
3.2.1	Progenitoras	55
3.2.2	Prole	55
3.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	56

3.3.1 Perfil Bioquímico do Leite e do Plasma.....	56
3.3.2 Metabolismo Energético	56
3.3.3 Sistema Antioxidante	58
2.3.4 Índices de Estresse Oxidativo e Neurotoxicidade	59
3.4 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS	60
3.4.1 Análises Histológicas	60
2.4.2 Análises Histoenzimológicas	61
4.0 RESULTADOS	64
4.1 PROGENITORAS	64
3.1.2 Análise Bioquímica do Leite e Plasma das Ratas	67
3.2.1 Desmames	71
3.2.2 Variáveis Corporais na Eutanásia	74
4.2.3 Perfil Bioquímico Plasmático.....	76
4.2.4 Metabolismo Energético	77
3.2.5 Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade	80
3.2.6 Análises Histomorfométricas	84
3.2.7 Análises de Componentes Principais	88
3.2.7 Análises de Caminhos	107
5.0 DISCUSSÃO	111
6.0 CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS	121
ANEXO.....	13939

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O crescente consumo de alimentos ricos em lipídios é uma característica que acompanha o desenvolvimento da população humana, e um dos principais fatores para o desenvolvimento da síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e outras doenças crônico-degenerativas não transmissíveis (ROCCISANO *et al.*, 2019; SILVA; MORAES; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, 2020; SIMOPOULOS, 2016; URIHO *et al.*, 2019). Contudo, é conhecido o efeito benéfico do consumo de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3 (ω -3) na redução do risco de doenças cardiovasculares e outras comorbidades associadas ou não à obesidade (SIMOPOULOS, 2020; SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016; URIHO *et al.*, 2019).

Dentre os principais efeitos dos AGPIs ω -3 estão a modulação do processo inflamatório, equilíbrio do sistema antioxidante e redução dos danos oxidativos, homeostase lipídica e redução dos danos causados pela dislipidemia (CALDER, 2015; SIMOPOULOS, 2020; URIHO *et al.*, 2019). Também tem sido demonstrado pela literatura que a ingestão desses AGPIs é fundamental durante a gestação, auxiliando no correto desenvolvimento do sistema nervoso central (DUNLAP; HEINRICHS, 2009; SABLE *et al.*, 2012). Sendo assim, a suplementação alimentar com esses ácidos graxos tem sido fortemente estimulada entre gestantes.

No entanto, alguns autores apontam que a ingestão de ω -3 em excesso pode acarretar prejuízos similares àqueles decorrente das altas concentrações ω -6 presentes nas dietas ocidentais modernas, como aumento dos processos inflamatórios e danos oxidativos, ganho de peso e alterações metabólicas e estruturais (BIANCONI *et al.*, 2018; CHURCH *et al.*, 2010). Neste sentido, o estado nutricional das progenitoras é essencial para o desenvolvimento adequado do embrião, sendo que perturbações do equilíbrio ideal de nutrientes podem afetar irreversivelmente o padrão metabólico da prole (EASTON; REGNAULT, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2020b; YAN *et al.*, 2013).

Dentre os tecidos suscetíveis às alterações no padrão metabólico durante o desenvolvimento embrionário, o músculo estriado esquelético apresenta grande risco de alterações induzidas por tais mudanças (CABEÇO *et al.*, 2012; MCCURDY *et al.*, 2016). Dentre os principais efeitos conhecidos do excesso de lipídios durante o desenvolvimento

muscular estão: a redução do padrão de expressão de genes reguladores da miogênese, alteração no perfil metabólico das fibras musculares, diminuição da capacidade oxidativa e redução da sensibilidade à insulina (CAMPODONICO-BURNETT *et al.*, 2020; MCCURDY *et al.*, 2016; PRATS-PUIG *et al.*, 2020; STUERMER *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2009).

Apesar de serem conhecidos os efeitos do desenvolvimento sob um ambiente com excesso de lipídeos, a literatura disponível sobre o tema ainda é carente. Existem poucos estudos que avaliam os padrões de alteração muscular durante o desenvolvimento embrionário sobre o efeito de doses supra recomendadas de AGPIs, sendo que os poucos estudos existentes estão relacionados aos efeitos da família ω -6. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar e comparar o padrão morfológico, metabólico e oxidativo do músculo estriado esquelético de ratos *Wistar* expostos a doses elevadas de AGPIs ω -3 e ω -6 durante o desenvolvimento.

1.2 JUSTIFICATIVA

Os benefícios dos ácidos graxos ω -3 para o desenvolvimento do organismo humano, em especial durante os períodos da gestação e lactação, tem sido objeto de diversos estudos nos últimos anos, e desta forma tem incentivado o consumo diário de capsulas de suplementação por mulheres durante o período gestacional. Os resultados desta prática são gradativamente melhores conforme a dose e duração da suplementação se elevam, por produzir uma maior incorporação de ω -3 nos diferentes tecidos do organismo. Na literatura são poucos os trabalhos que buscam investigar os efeitos de altas doses desses ácidos graxos para o organismo em especial durante o desenvolvimento. Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos de doses supra recomendadas de AGPIs ω -3 e ω -6, sobre o desenvolvimento muscular estriado esquelético de ratos *Wistar* cronicamente suplementados durante a gestação e lactação.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação crônica com doses supra recomendadas de AGPI ω -3 e ω -6 sobre o desenvolvimento, metabolismo energético e sistema antioxidante dos tecidos muscular estriado esquelético, hepático e adiposo na geração F1 de ratos *Wistar*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ω -3 e ω -6 sobre o desenvolvimento das proles (programação metabólica);
- Comparar se os efeitos da suplementação com AGPIs das duas famílias sobre as características musculares, hepáticas e adiposas;
- Avaliar a manutenção dos efeitos da suplementação crônica após o desmame, sobre as variáveis histomorfométricas, metabolismo energético, sistema antioxidante e danos oxidativos do músculo estriado esquelético de ratos;
- Avaliar a manutenção dos efeitos da suplementação crônica após o desmame sobre o metabolismo energético, sistema antioxidante e danos oxidativos do fígado de ratos;
- Avaliar a manutenção dos efeitos da suplementação crônica após o desmame sobre o *status* de estresse oxidativo do tecido adiposo de ratos;

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIETA E EVOLUÇÃO HUMANA

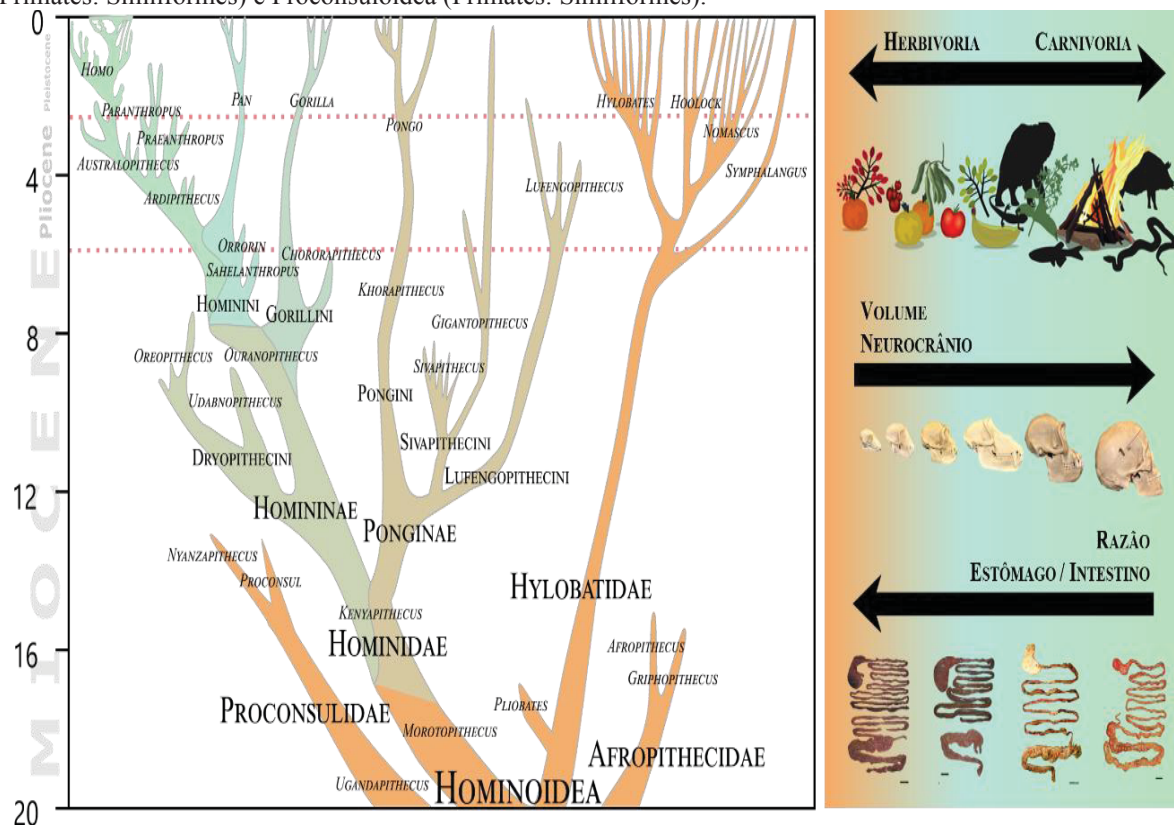
Uma das características mais notáveis em todas as sociedades humanas é a escolha de alimentos e composição de dietas. Contudo, além dos vieses social e comportamental envolvidos nesse processo, alterações dietárias foram fundamentais para o processo evolutivo dos Catarrhini no Mioceno Inferior (ANDREWS; JOHNSON, 2020). A transição de dietas exclusivamente frugívoras e herbívoras para dietas onívoras com grande representatividade carnívora, foi uma das principais características que levaram os Hominoidea ao aumento da capacidade encefálica (Figura 1), interações sociais extremamente complexas e aumento da longevidade (CRITTENDEN; SCHNORR, 2017; MCGROSKY *et al.*, 2019).

O processo de forrageio dos Homininae caçadores-coletores associado a transição dietaria desses animais, foi um marco fundamental para o processo evolutivo do grupo. Devida a necessidade de estratégias para a caça, memorização de rotas e locais de coletas, manuseio de alimentos e ferramentas, o bipedalismo e o aumento cognitivo se fixou nessas linhagens (CRITTENDEN; SCHNORR, 2017; ROCCISANO *et al.*, 2019). No entanto, a demanda energética necessária para a manutenção de um encéfalo cada vez maior (Figura 1) forçava os indivíduos a passar grande parte do tempo a procura de alimento (ANDREWS; JOHNSON, 2020; HAILE; NEME; BELACHEW, 2017). Como consequência, as linhagens mais derivadas de Hominini apresentam redução da musculatura e aumento das reservas adiposas, quando comparados aos outros grupos (CRITTENDEN; SCHNORR, 2017; LEONARD; SNODGRASS; ROBERTSON, 2007).

Com a aprimoração das técnicas de coleta e de caça, os Hominini mais derivados começaram a compreender e dominar processos de agricultura, levando ao início do cultivo de plantas e domesticação de animais. O aumento da habilidade agrícola e pecuária foi essencial para a gradativa sedentarização e redução do forrageio (ROCCISANO *et al.*, 2019; SANIOTIS; HENNEBERG, 2013). Ao estabelecer a agricultura, houve redução na ingestão de carnes e aumento na ingestão de grãos. Esse padrão dietário estabelecido com o domínio de técnicas agrícolas foi o principal responsável pelo crescimento do consumo de ácidos graxos (CRITTENDEN; SCHNORR, 2017; HAILE; NEME; BELACHEW, 2017; ROCCISANO *et al.*, 2019).

O crescente aumento do consumo de lipídios associado a redução da atividade física, são os responsáveis pelo surgimento de diversas doenças metabólicas nas sociedades pós dominação da agricultura (SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016). Após a revolução industrial, o excesso de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos se tornaram cada vez mais abundantes e representativos na nutrição humana, sendo o fator chave para o crescimento exponencial de obesidade e demais comorbidades associadas a esse estilo de vida (CRITTENDEN; SCHNORR, 2017; HAILE; NEME; BELACHEW, 2017; ROCCISANO *et al.*, 2019; SANIOTIS; HENNEBERG, 2013).

Figura 1 - Representação da árvore de consenso dos grandes símios das superfamílias Hominoidea (Gray, 1825) (Primates: Simiiformes) e Proconsuloidea (Primates: Simiiformes).



Legenda: Os ramos inferiores representando as subfamílias extintas Proconsulinae (Leakey, 1963) (Simiiformes: Proconsuloidea) e Afropithecinae (Andrews, 1992) (Simiiformes: Proconsuloidea). Esquematização da diversificação das famílias Hylobatidae (Gray, 1870) e Hominidae (Gray, 1825) no Mioceno Inferior (± 22 milhões de anos). Diversificação das subfamílias Ponginae (Allen, 1925) e Homininae (Gray, 1925) no Mioceno Médio (± 14 milhões de anos). Diversificação das tribos Gorillini (Frechkop, 1943) e Hominini (Gray, 1825) no Mioceno Superior (± 8 milhões de anos). Presença de dietas estritamente herbívoras nas espécies basais de toda a infraordem Catarrhini (E. Geoffroy, 1812) e manutenção dessa característica nos Hylobatidae atuais. Transição gradual para dieta onívora nas espécies basais e atuais de Ponginae e Gorillini e predominância de dietas carnívoras em Homini. Relação direta da mudança alimentar com o aumento do volume do neurocrânio e redução da razão do estômago / intestino com o aumento da onívoros e carnívoros (ANDREWS; JOHNSON, 2020; MCGROSKY *et al.*, 2019). Representação dos crânios de *Proconsul* (Hopwood, 1933), *Hylobathes* (Illiger, 1811), *Sivapithecus* (Pilgrim, 1910), *Pongo* (Lacépède 1799), *Gorilla* (Geoffroy, 1852) e *Homo* (Linnaeus, 1758). Representação do sistema digestório de *Nomascus leucogenys* (Ogilby, 1840), *Symphalangus syndactylus* (Chivers, 1974), *Pongo pigmaeus* (Linnaeus, 1760), *Gorilla gorilla* (Savage and Wyman, 1847). Cladograma adaptado e modificado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hominini_lineage.svg#/media/File:Hominoidea_lineage.svg

2.1.1 Dietas Ocidentais e Orientais

O processo de adoção de práticas associadas à cultura ocidental europeia é denominado de ocidentalização. O êxodo do estilo de vida rural durante a revolução industrial no século XVIII, juntamente com a própria industrialização, promoveram alterações importantes na alimentação da maior parte das sociedades humanas (ANDREWS; JOHNSON, 2020; BIOBAKU *et al.*, 2019; MASSIERA *et al.*, 2010). A redução do trabalho manual em decorrência das tecnologias criadas, favoreceu a redução dos custos e aumento do volume de produção, facilitando o acesso da população a maior quantidade de alimentos (HARIHARAN; VELLANKI; KRAMER, 2015).

Alimentos com altos índices glicêmicos, como os carboidratos, possuem papel importante na nutrição humana no estilo de vida ocidental. O consumo de cereais refinados, grãos, tubérculos e açúcares, como sacarose, frutose e lactose são as principais fontes de alimento das sociedades modernas. A glicose, oriunda da digestão desses carboidratos, é responsável por cerca de 40-75% do fornecimento de energia nessas dietas (BRION *et al.*, 2010; KOPP, 2019). Além disso, o aumento da ingestão de grãos e cereais é responsável, junto com o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura, por fornecer maior aporte lipídico para as dietas modernas (SIMOPOULOS, 2020; SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016). Além do aumento da ingestão de ácidos graxos saturados, as dietas ocidentais promovem desbalanço na proporção de ácidos graxos polinsaturados (AGPI), aumentando a disponibilidade de AGPIs ômega-6 e redução de AGPIs ômega-3 (CALDER, 2015; SIMOPOULOS, 2000). Uma dieta rica em ácidos graxos ômega-6 é pró-inflamatória e tem sido fator determinante para o desenvolvimento de várias doenças crônicas não transmissíveis e comorbidades associadas à síndrome metabólica (GEPSTEIN; WEISS, 2019; RENAUD *et al.*, 2014).

A prevalência de obesidade cresce anualmente desde a década de 1980, sendo considerada uma pandemia que afeta cerca de 650 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2020). É amplamente aceito que a obesidade resulta de um excesso crônico de ingestão em comparação com o gasto de energia, o que leva ao armazenamento de quantidades excessivas de triacilgliceróis no tecido adiposo (ESTADELLA *et al.*, 2013; KOPP, 2019). Devida a característica hiperglicêmica da dieta, altos níveis de insulina são constantemente secretados, promovendo o armazenamento de gordura e agravamento do quadro metabólico (NEUSCHWANDER-TETRI, 2017).

Figura 2 - Representação esquemática da composição da Dieta Ocidental e Dieta Mediterrânea



Fonte: Adaptado de: <https://www.barillacfn.com/media/images/doppia-piramide-en.jpg>.

Ao contrário de outras regiões do mundo, as populações adjacentes ao Mar Mediterrâneo mantiveram o hábito de cultivar os seus alimentos e optar por um modelo de alimentação sustentável mesmo após a revolução industrial (HAILE; NEME; BELACHEW, 2017; SILVA; MORAES; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, 2020). A composição da dieta mediterrânea consiste em quantidades elevadas de azeitonas e azeites, frutas regionais, vegetais e cereais não refinados, leguminosas e nozes, quantidades moderadas de peixes e laticínios e quantidades reduzidas de carne vermelha e derivados (DERNINI; BERRY, 2015; HAILE; NEME; BELACHEW, 2017).

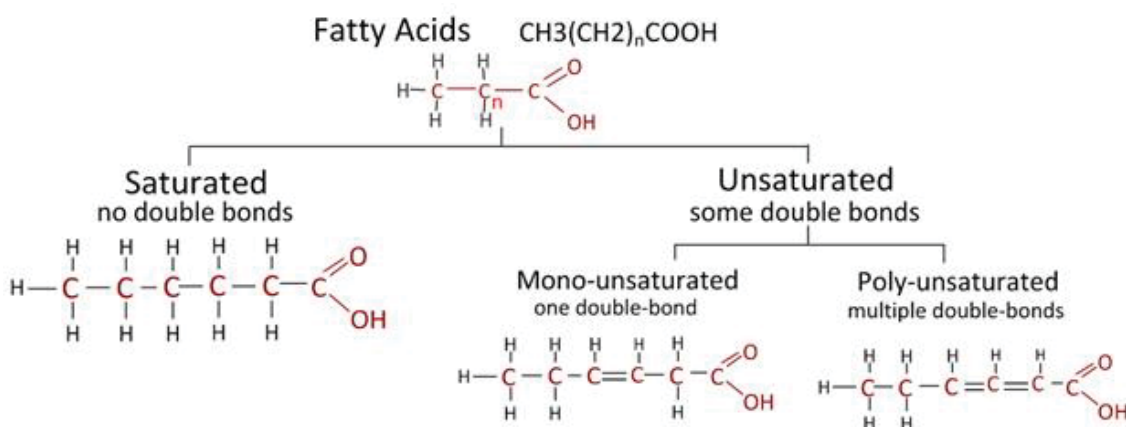
Outras dietas orientais, como a dieta japonesa, se assemelha à mediterrânea pelo consumo de frutas, vegetais e cereais, grandes quantidades de arroz, proteínas derivadas de grãos e peixes, mas apresenta baixo consumo de gorduras, azeites e de carne vermelha (HAILE; NEME; BELACHEW, 2017; ZHANG *et al.*, 2015). De uma forma geral, as dietas orientais apresentam consumo de peixes e frutos do mar em maior quantidade do que as dietas ocidentais, fornecendo maiores quantidades de AGPIs ômega-3. Além disso, a redução do consumo de cereais refinados, carnes ricas em gorduras e menor consumo de açúcar e produtos industrializados, reduz a incidência de obesidade e comorbidades associadas à síndrome metabólica (CALDER, 2015; DERNINI; BERRY, 2015; SIMOPOULOS, 2011; ZHANG *et al.*, 2015).

2.2 ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídios são um grupo de moléculas orgânicas formadas por cadeias carbônicas não ramificadas, que possuem como fator de agrupamento a característica hidrofóbica das moléculas. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos derivados de hidrocarbonetos, raramente possuindo átomos diferentes de carbono, hidrogênio e em menor ocorrência oxigênio. As cadeias carbônicas possuem uma extremidade carboxila e outra metila terminal, e são diferenciadas entre si pelo comprimento, presença e localização de insaturações (BURDGE; CALDER, 2015; NELSON; COX, 2014; WIKTOROWSKA-OWCZAREK; BEREZINSKA; NOWAK, 2015). Devido a grande variedade, os ácidos graxos apresentam funções diversas nos sistemas biológicos, sendo eles estruturais, fonte e reserva de energia, sinalizadores e transdutores de sinal, isolantes e impermeabilizantes, entre outras (BURDGE; CALDER, 2015; NELSON; COX, 2014).

A maior parte dos ácidos graxos possui cadeia carbônica com média entre 12 e 24 carbonos, no entanto podem ocorrer cadeias mais curtas (4 carbonos) e mais longas (até 36 carbonos). Algumas poucas exceções de anéis carbônicos e ramificações de grupamentos metila, mas de forma geral não apresentam qualquer ramificação (RIDGWAY; MCLEOD, 2015; SCHMELZER *et al.*, 2007). Alguns ácidos graxos apresentam a cadeia hidrocarbonada completamente saturada (Figura 3), ou seja, apresentando apenas ligações simples entre os carbonos. No entanto, outras moléculas apresentam uma insaturação (monoinsaturadas) ou mais insaturações (polinsaturadas) na cadeia carboxílica (BURDGE; CALDER, 2015; NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Classificação dos Ácidos Graxos, fórmula e estrutura química geral, estrutura química dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados



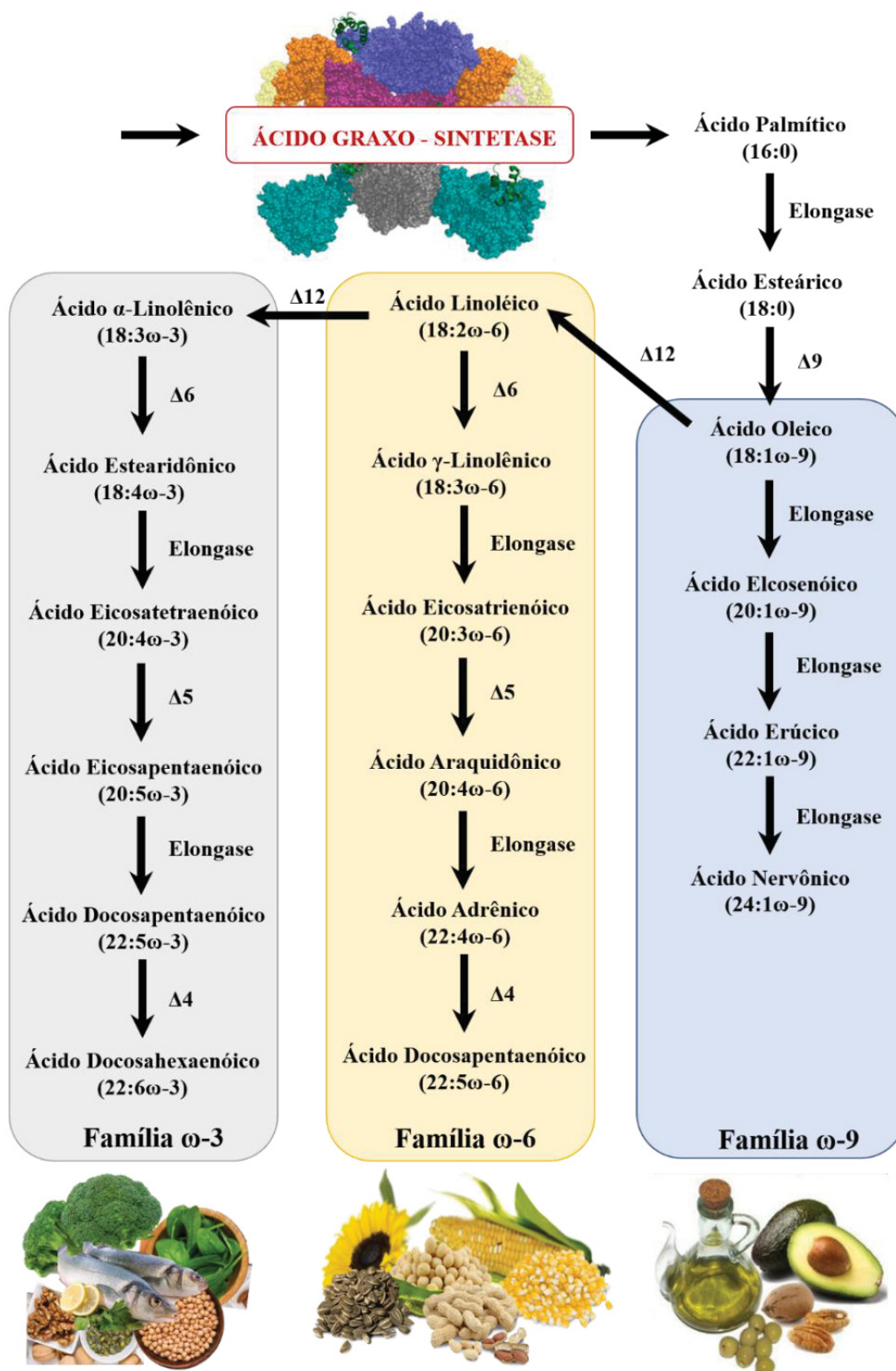
Fonte: <https://oilpalmblog.files.wordpress.com/2014/01/fatty-acids-2.jpg>.

A maior parte dos ácidos graxos apresentam número par de átomos de carbono, resultante da sua síntese, com sucessivos agrupamentos de acetato, unidades com dois carbonos. Da mesma forma, as insaturações nas cadeias apresentam posições regulares e são em conformação *cis* (Figura 3), sendo que nos monoinsaturados elas ocorrem entre os carbonos C9 e C10 (família ômega-9). Nos polinsaturados a primeira insaturação ocorre entre os carbonos C6 e C7 (família ômega-6) ou C3 e C4 (família ômega-3), e as demais entre os carbonos C12 e C13 e C15 e C16. Raramente ocorre a conjugação de insaturações, sendo normalmente separadas por pelo menos uma ligação simples (NELSON; COX, 2014; RIDGWAY; MCLEOD, 2015; SCHMELZER *et al.*, 2007).

A síntese desses ácidos graxos (Figura 4) é catalisada pela ácido graxo-sintase, um complexo citoplasmático multienzimático, que adiciona sequencialmente os acetatos aos grupamentos acila saturados. Em cada ciclo de passagem pela ácido graxo-sintase, a cadeia carbônica em condensação é acrescida de dois carbonos, sendo que o principal produto desse processo é o ácido palmítico (16:0), principal ácido graxo de Mammalia com 16 carbonos e totalmente saturado. No entanto, alguns tecidos possuem complexos enzimáticos capazes de liberar ácidos graxos com cadeias mais curtas (BURDGE; CALDER, 2015; NELSON; COX, 2014). Nas células eucarióticas ocorre a produção de ácidos graxos de cadeias mais longas, a partir do processo de alongamento do ácido palmítico (16:0), catalisado por enzimas denominadas de elongases, que atuam transferindo mais dois carbonos do complexo malonil-CoA para a cadeia carbônica. Existem diversas isoformas de elongases, sendo que alguns grupos atuam preferencialmente em ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto outras atuam preferencialmente em ácidos graxos polinsaturados (BURDGE; CALDER, 2015; GUILLOU *et al.*, 2010).

O processo de síntese de ácidos graxos insaturados (Figura 4) ocorre através do alongamento realizado pelas elongases e a inserção de insaturações pelas dessaturases. O mecanismo de dessaturação das cadeias hidrocarbonadas é uma plesiomorfia de Bacteria, Archaea e Eukarya (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018). Os primeiros substratos para o processo de dessaturação são os ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0), e a reação que ocorre com maior frequência é catalisada pela Δ^9 dessaturase, formando ácidos graxos da família ômega-9 (BURDGE; CALDER, 2015). Todos os Eukarya possuem a capacidade de produzir ácidos graxos polinsaturados das famílias ômega-6 e ômega-3, mas existe diferença na expressão das dessaturases em Animalia e Viridiplantae (BURDGE; CALDER, 2015; GUILLOU *et al.*, 2010).

Figura 4 - Esquema da síntese de Ácidos Graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados



Legenda: Síntese através da atividade da ácido graxo sintetase citoplasmática, formando ácido palmítico (16:0). Atividade das enzimas elongases e dessaturases ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$ e $\Delta 12$) e formação dos ácidos graxos monoinsaturados da família ômega-9 e dos ácidos graxos polinsaturados da família ômega-6 e ômega-3. Vias de alongamento e dessaturação dependentes dos precursores ácido oleico (18:1ω-9), ácido linoléico (18:2ω-6) e α-linolênico (18:3ω-3). Principais fontes alimentares de obtenção representadas abaixo da via de síntese de cada família. Esquema baseado em trabalhos publicados anteriormente (BURDGE; CALDER, 2015).

As dessaturases expressas em Viridiplantae possuem a capacidade de introdução de uma nova ligação dupla entre uma ligação dupla existente e o grupamento metil terminal da cadeia carbônica. O ácido oleico (18:1 ω -9) é o precursor do ácido linoléico (18:2 ω -6) através da inserção de uma nova dupla ligação entre os carbonos C12 e C13, catalisada pela Δ 12 dessaturase. A partir do ácido linoléico, mais uma dessaturação pode ocorrer, dessa vez pela Δ 15 dessaturase, que insere uma dupla ligação entre os carbonos C15 e C16 levando à produção do ácido α -linolênico (18:3 ω -3). Esses dois ácidos graxos produzidos, linoléico e α -linolênico, são os ácidos graxos mais simples das famílias ômega-6 e ômega-3 e são essenciais para a dieta de Mammalia (BURDGE; CALDER, 2015; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; GUILLOU *et al.*, 2010).

Durante o processo evolutivo de Mammalia, a atividade e expressão da Δ 12 e Δ 15-dessaturases foi sendo reduzida drasticamente, tornando ineficiente a produção dos ácidos linoléico e α -linolênico. Devido a necessidade desses precursores para a atividade celular, o consumo dietário desses ácidos graxos essenciais é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do organismo desses animais (CALDER, 2015; LEIKIN-FRENKEL, 2016; SHRESTHA *et al.*, 2020b; SIMOPOULOS, 2016). Contudo, com a presença desses ácidos graxos essenciais, os Mammalia conseguem realizar o alongamento e dessaturação dessas cadeias precursoras em ácidos graxos mais longos e insaturados (Figura 4). A enzima Δ 6 dessaturase insere uma dupla ligação entre os carbonos C6 e C7 de ambos os precursores. Após essa dessaturação, ocorre o alongamento da cadeia carbônica pela ação da elongase 5, originando ácidos graxos de 20 carbonos. Já essas cadeias, através da Δ 5 dessaturase recebem uma nova dupla ligação entre os carbonos C5 e C6, formando os ácidos araquidônico (20:4 ω -6) e eicosapentaenóico (20:5 ω -3). Esse processo ocorre até a formação de ácidos com cadeias carbônicas extremamente longas (Figura 4), como os ácidos docosapentaenóico (22:5 ω -6) e docosahexaenóico (22:6 ω -3) (BURDGE; CALDER, 2015; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; GUILLOU *et al.*, 2010).

A via de dessaturação e alongamento de ácidos graxos nos Mammalia é expressa predominantemente no retículo endoplasmático liso do tecido hepático. Os ácidos oleico, linoléico e α -linolênico são substratos competitivos e limitadores da atividade da Δ 6 dessaturase, sendo o ácido α -linolênico o substrato com maior preferência para essa enzima, seguido pelo linoléico e oleico. Contudo, a prevalência de ácido linoléico nas dietas, promove maior taxa de metabolização de ômega-6 (BURDGE; CALDER, 2015)

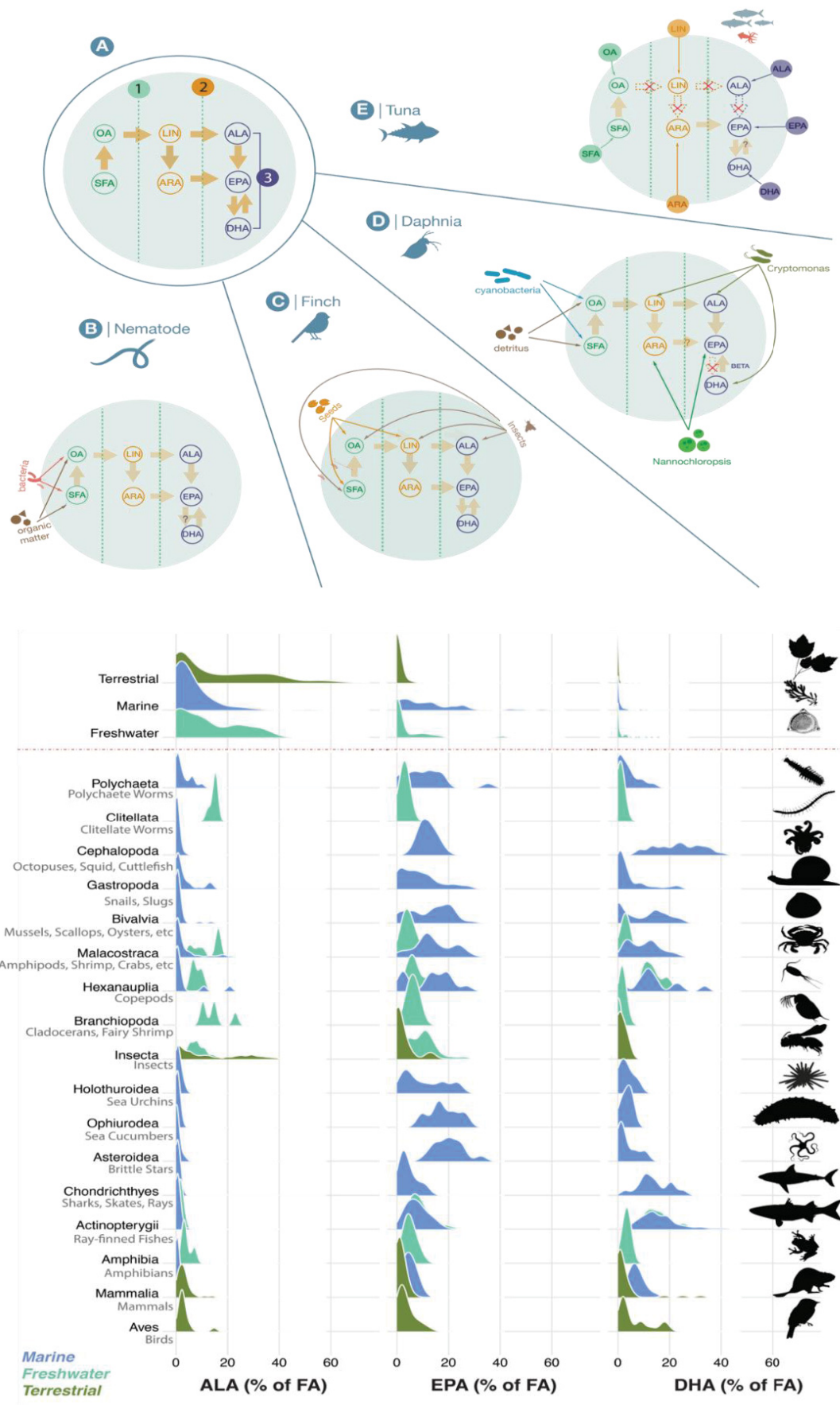
2.2.1 Capacidade de Síntese de AGPIs

Os ambientes marinhos são os responsáveis por quase que toda a produção de ácidos graxos da família ômega-3, principalmente por protozoários, algas e algumas bactérias (KABEYA *et al.*, 2018). Da mesma forma, sabe-se que praticamente toda a produção de ácidos graxos da família ômega-6 ocorre em ambientes terrestres, principalmente pelas plantas vasculares (VENEGAS-CALERÓN; SAYANOVA; NAPIER, 2010). Esse contraste de produção de AGPIs em ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres, pode estar relacionado e/ou ter induzido o processo de evolução metabólica divergente dos organismos desses ambientes (TWINING *et al.*, 2020). A completa perda da atividade das $\Delta 12$ e $\Delta 15$ dessaturases por grande parte dos Animalia impede a conversão de ácidos graxos saturados em polinsaturados, fazendo com que esses animais necessitem obter esses lipídios pela alimentação (CASTRO; TOCHER; MONROIG, 2016; MONROIG; KABEYA, 2018; TWINING *et al.*, 2020).

Uma característica importante que diferencia os produtores terrestres dos aquáticos marinhos (Figura 5), é a capacidade das Tracheophyta em produzirem apenas ácido α -linolênico ($18:3\omega-3$, ALA). Enquanto isso, as Bacillariophyta, Cryptophyta e algumas Embryophyta basais de ambientes de transição, apresentam grande concentração de eicosapentaenóico ($20:5\omega-3$, EPA) e docosahexaenóico ($22:6\omega-3$, DHA) (GLADYSHEV *et al.*, 2009; TWINING *et al.*, 2020). Essa divergência nesses ecossistemas distintos, pode estar relacionada com a maior sensibilidade de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, como por exemplo EPA e DHA, aos fatores ambientais. Sabe-se que as cadeias com mais de 20 carbonos e insaturações apresentam maior suscetibilidade à peroxidação do que cadeias menores, dessa forma os ácidos graxos longos são mais facilmente degradados em ambientes terrestres (BURDGE; CALDER, 2015; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; TWINING *et al.*, 2020).

Mesmo com a maior suscetibilidade a danos oxidativos, os AGPIs desempenham papel importante na estrutura das membranas celulares dos Animalia e dos Viridiplantae (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; KOMPRDA, 2012; MENZEL *et al.*, 2019). Os ácidos graxos ômega-6 participam de processos importantes para as Tracheophyta, atuando como substratos para a produção de compostos secundários, como o jasmonato (VENEGAS-CALERÓN; SAYANOVA; NAPIER, 2010). Em organismos marinhos o ômega-3 atua como proteção à alta salinidade de regiões mais frias (SUI *et al.*, 2010).

Figura 5 - Diferença na capacidade de síntese de AGPIs

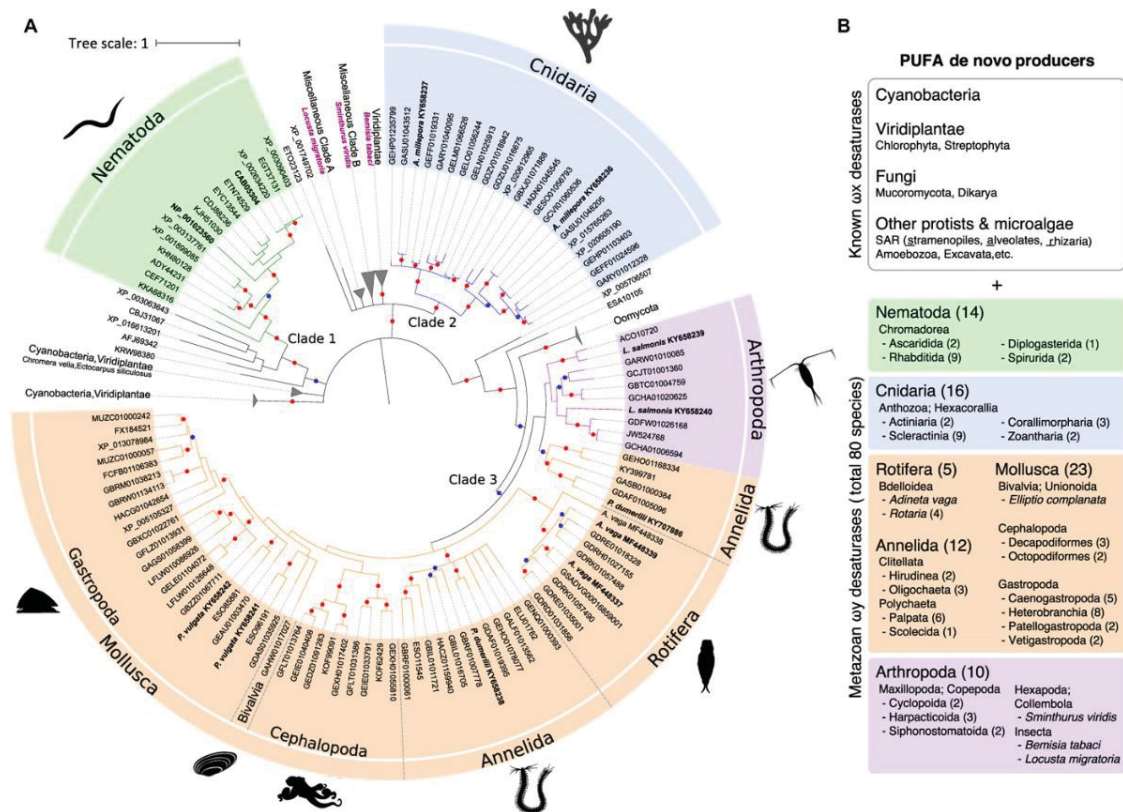


Legenda: Dentro dos produtores primários (A), as plantas terrestres vasculares são apenas capazes de sintetizar ácidos graxos até ALA, enquanto diferentes espécies de algas e plantas terrestres não vasculares (por exemplo, musgos e hepáticas) também são capazes de produzir EPA e DHA. Os consumidores (B-E) desenvolveram capacidades de síntese que diferem com base na disponibilidade dos principais ácidos graxos em suas dietas. Enquanto alguns consumidores (B) são capazes de sintetizar AGPI, outros (CD) requerem AGPI ômega-3 de cadeia curta da dieta, e ainda outros (E) deve receber todos os ácidos graxos essenciais diretamente da dieta. Diferença na composição de AGPIs, principalmente ômega-3. Diferenças pronunciadas nos produtores (acima da linha vermelha pontilhada), mas também presentes em consumidores de um mesmo táxon em ecossistemas diferentes. É possível notar que os animais carnívoros apresentam maiores concentrações de ALA, EPA e DHA na composição corporal, contudo necessitam, em grande parte, de obtenção através da alimentação. Esquema adaptado de <https://authorea.com/users/366595/articles/486301-the-evolutionary-ecology-of-fatty-acid-variation-implications-for-consumer-adaptation-and-diversification>.

Contudo, além das divergências entre os ecossistemas, ocorrem vários padrões de distribuição entre táxons dentro de um mesmo ecossistema. É possível notar que em procariotos marinhos, como as algas fotossintetizantes ocorre a produção de EPA e DHA enquanto em cianobactérias não são encontradas essas moléculas (TWINING *et al.*, 2020; VENEGAS-CALERÓN; SAYANOVA; NAPIER, 2010). As diferenças entre táxons do mesmo ecossistema podem estar relacionadas com fatores ambientais, químicos e físicos (Figura 5). Uma vez que os AGPIs são moléculas menos estáveis e mais suscetíveis à espécies reativas de oxigênio, variação de temperatura e luminosidade, em ambientes tropicais é mais custoso manter essas moléculas (HIXSON; ARTS, 2016; TWINING *et al.*, 2020). Da mesma forma ocorrem diferenças na composição lipídica corporal entre semaforontes, principalmente quando em estágios diferentes o organismo muda drasticamente de ambiente (TWINING *et al.*, 2018, 2020).

No entanto, em alguns grupos de Animalia (Figura 6), foram encontrados genes e produção ativa de AGPIs ômega-3 e ômega-6 a partir de ácido palmítico (16:0), sugerindo que alguns táxons conseguem realizar a síntese *de novo* desses ácidos graxos (KABEYA *et al.*, 2018). Os estudos nesse sentido foram incentivados após a descrição de produção ativa e independente de ômega-3 em algumas espécies de Nematoda terrestres (MENZEL *et al.*, 2019). Após essa constatação, as investigações levaram os pesquisadores a procurarem características similares em outros grupos diversos, sendo que foram encontradas atividades homologas em Cnidaria, Mollusca, Annelida, Hexapoda, Nematoda e indícios em Chordata não Craniata (KABEYA *et al.*, 2018; MENZEL *et al.*, 2019; MONROIG; KABEYA, 2018; TWINING *et al.*, 2020).

Figura 6 - Distribuição das $\Delta 12$ e $\Delta 15$ dessaturase em Animalia



Legenda: A: árvore filogenética consensada, descrevendo as relações entre as dessaturases de Cyanobacteria (8 sequências) e Eukarya (279 sequências). Os filões de Eumetazoa (121 sequências) são nomeados na árvore e atribuídos com cores para os seguintes táxons: Nematoda (verde), Cnidaria (azul), Arthropoda (roxo) e Lophotrochozoa (laranja). Os clados não metazoários foram agrupados e nomeados de acordo com sua composição taxonômica geral e contém representantes Amoebozoa, Apusozoa, Haptophyceae, Heterolobosea, Nucleriidae, SAR, Chlorophyta, Rodophyta, Cryophyta, Escavata e Fungi. A árvore apresentada corresponde à árvore de consenso em 80%. Pontos coloridos nos nós representam valores de suporte de 80% ou mais, para as análises de MrBayes e PhyloBayes (azul) ou para as análises MrBayes, PhyloBayes e RAxML (vermelho). B: Resumo dos grupos taxonômicos destacando os Eumetazoa nos quais as dessaturases foram identificadas. O número de espécies está identificado entre parênteses. Fonte: KABEYA, Naoki et al. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. Science advances, v. 4, n. 5, p. eaar6849, 2018.

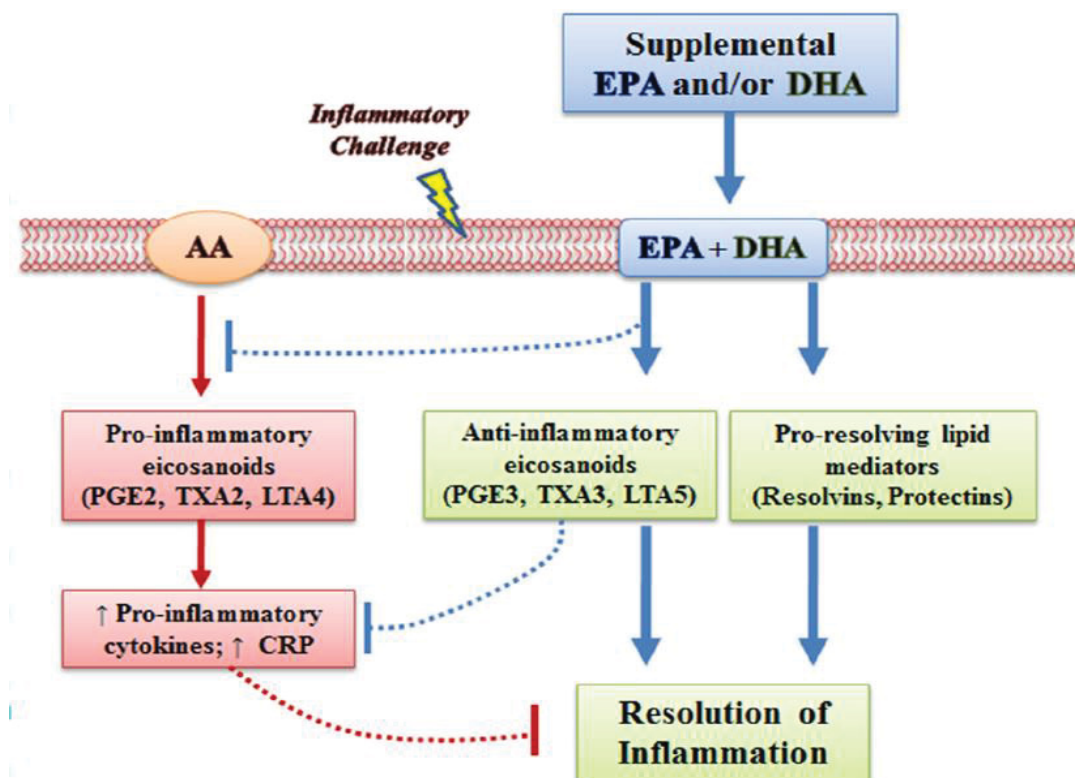
2.2.2 Funções dos Ácidos Graxos em Euarchontoglires

Os ácidos graxos são armazenados em forma de triacilgliceróis (TAG), nos adipócitos dos panículos adiposos e entremeados em estruturas conjuntivas, também em menor quantidade nas gotículas lipídicas intramusculares. A liberação de TAG dos adipócitos é controlada pela ativação da lipase hormônio sensível, que é regulada positivamente pelo sistema adrenérgico e glucagon liberando TAG no plasma, e negativamente pela ação da insulina promovendo captação de glicose e síntese de TAG (MASSCHELIN *et al.*, 2020; PAYOLLA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2008).

A liberação de ácidos graxos pela hidrólise de TAG fornece precursores metabólicos para a geração de energia através da via de β -oxidação de ácidos graxos em mitocôndrias e peroxissomos. A via de β -oxidação é controlada pela concentração intracelular desses ácidos graxos, diretamente influenciada pela concentração plasmática de TAG (JANA *et al.*, 2019; LAI *et al.*, 2020). A determinação de qual via de β -oxidação é dependente do tamanho da cadeia carbônica da molécula, sendo que ácidos graxos de cadeia curta são direcionados com maior facilidade para as mitocôndrias, enquanto os de cadeia longa seguem para os peroxissomos (BOSMA, 2016; CALDER, 2015).

Além do papel metabólico, os ácidos graxos atuam de forma essencial na estrutura e função das membranas celulares. A composição da bicamada lipídica atua sobre a fluidez da membrana, que por sua vez pode modificar as atividades e interações entre as proteínas integrais (CALDER, 2015). A composição geral de ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana depende de cada tipo celular, tecido e organismo. Além disso, os lipídios de membrana podem ser substratos para a produção de mensageiros em vias de transdução de sinal (RAPOPORT; RAO; IGARASHI, 2007; TANG; LANE, 2012).

Figura 7 - Esquema da via de produção de eicosanoides



Legenda: Em vermelho os derivados de ácido araquidônico (ômega-6), pró-inflamatórios. Em verde os derivados de ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico (ômega-3), anti-inflamatórios e resolvidores do processo inflamatório. Fonte: <https://i.pinimg.com/564x/ff/02/62/ff0262eb83257c6c5dc7101538c0e677.jpg>

As cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios são metabolizadas pelas enzimas fosfolipases, originando diversos mensageiros secundários. Os eicosanoides são um grupo de mediadores bioativos derivados do metabolismo de ácidos graxos polinsaturados com cadeias de 20 carbonos. Os principais eicosanoides são as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, e são produzidos a partir dos ácidos graxos pelas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (CALDER, 2015; KOMPRDA, 2012). Os eicosanoides derivados de ácidos graxos ômega-6 possuem papel importante no processo inflamatório e como regulador de respostas imunológicas, enquanto os derivados de ácidos graxos ômega-3 possuem menor reatividade inflamatória e imunitária (CHRISTI; HARWOO, 2020). Além disso, os mediadores formados a partir de ácidos graxos ômega-3 possuem papel importante no processo de controle e resolução do processo inflamatório, essas moléculas são denominadas de resolvinas e protectinas (CALDER, 2015; CHRISTI; HARWOO, 2020).

Também originada da hidrólise das cadeias carbônicas dos lipídios de membrana, mensageiros secundários podem ativar proteínas citosólicas responsáveis pela transdução de sinal, como as proteínas quinases e também moléculas relacionadas a regiões promotoras de genes (MASSARO *et al.*, 2007; ROCCISANO *et al.*, 2019).

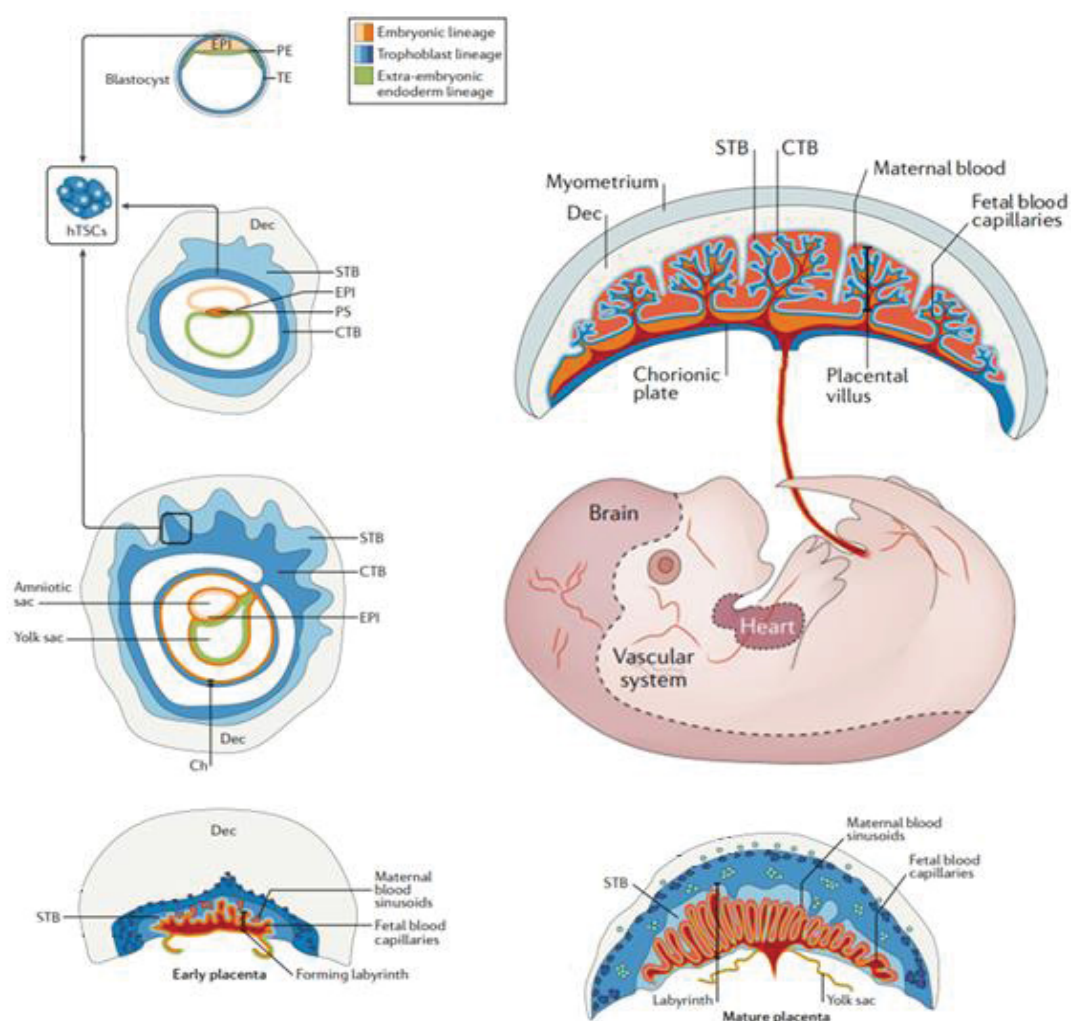
2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O processo de desenvolvimento embrionário, a morfogênese e a organogênese são amplamente estudados em várias linhagens celulares e modelos animais. Os embriões de Mammalia possuem como característica do seu desenvolvimento inicial, o controle ser definido pelas interações celulares e ambientais, restrições geométricas e redistribuição de forças, além de redes regulatórias associadas a genes adaptativos. Sendo assim, a condução do desenvolvimento tridimensional desses embriões até a sua implantação, é dependente da capacidade de auto organização frente aos estímulos recebidos (KLIMCZEWSKA; KASPERCZUK; SUWIŃSKA, 2018; PŁUSA; PILISZEK, 2020). Embora haja variações entre Prototheria, Metatheria e Eutheria, o processo de desenvolvimento é amplamente conservado em todas as 5 superordens de Eutheria (FRANKENBERG *et al.*, 2016).

Os estágios pré-implantação levam a formação de duas linhagens celulares distintas no blastocisto, a massa celular interna e o trofotoderma. A massa celular interna, nos dias que se seguem do desenvolvimento dão origem ao epiblasto e o endoderma primitivo, que formarão o embrião e o saco vitelínico, respectivamente. O processo de implantação promove a

decidualização das células do estroma endometrial, regulada principalmente pela ação dos hormônios esteroidais maternos, essa ação é amplamente conservada entre os Euarchontoglires (HEMBERGER; HANNA; DEAN, 2020; RAMATHAL *et al.*, 2010). Nos próximos estágios a interação entre o trofoblasto e a decídua, e a consequente formação do sinciciotrofoblasto, são fundamentais para a progressão normal da placentação e do desenvolvimento (WOODS *et al.*, 2017).

Figura 8 - Esquema dos estágios de desenvolvimento de Eutheria a partir do blastocisto até a placenta madura



Legenda: EPI: Epiblasto; PE: Endoderma Primitivo; TE: Trofotoderma; DEC: Decídua; STB: Sinciciotrofoblasto; CTB: Citotrofoblasto; Ch: Córion; PS: Linha Primitiva Emergente; hTSCs: fonte de células embrionárias para estudos de desenvolvimento animal. Adaptado de HEMBERGER, Myriam; HANNA, Courtney W.; DEAN, Wendy. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 1, p. 27-43, 2020.

A invaginação de vasos sanguíneos extra embrionários derivados do mesoderma do trofoblasto, juntamente com os seios sanguíneos do endométrio gera a estrutura básica do labirinto placentário. A expansão desse labirinto decorrente do amadurecimento do sinciciotrofoblasto permite uma justaposição entre a circulação fetal e materna, garantindo

nutrição eficiente e troca gasosa entre a mãe e o feto (HEMBERGER; HANNA; DEAN, 2020; WOODS *et al.*, 2017). A partir da placentação, o feto em formação é dependente nutricionalmente da progenitora, sendo diretamente afetado por qualquer alteração metabólica materna (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; HEMBERGER; HANNA; DEAN, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2020a).

2.3.1 Nutrição Materna e Programação Metabólica

Ao longo do período gestacional ocorrem alterações e aumento da necessidade nutricional do feto, sendo assim o estado nutricional e a capacidade de adaptação materna são fundamentais para o correto desenvolvimento embrionário. No entanto, há uma faixa de equilíbrio restrita dentro da qual as alterações maternas podem flutuar, sendo que o aumento ou redução do aporte nutricional fora desse intervalo influenciam no desenvolvimento da prole (CONFORTIM *et al.*, 2017; EASTON; REGNAULT, 2020; GEPSTEIN; WEISS, 2019). Essas alterações promovem efeitos moduladores do padrão de expressão gênica da prole alterando a estrutura e metabolismo fetal, evento conhecido como programação metabólica, sendo um fator crucial para a determinação do surgimento de doenças até mesmo durante a vida adulta desses animais (KOPP, 2019; SHRESTHA *et al.*, 2020b; YAN *et al.*, 2013).

A obesidade materna, ou mesmo uma dieta rica em gorduras, está relacionada com alterações significativas de peso e tamanho das proles, bem como o padrão de desenvolvimento dos tecidos mesenquimais e musculares. O excesso de lipídios no organismo materno, além de proporcionar deposição adiposa nas mães e aumento dos triacilgliceróis e colesterol plasmático, atua sobre o transporte placentário promovendo aumento do aporte lipídico plasmático dos filhotes em desenvolvimento (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; HERRERA; DESOYE, 2016; PAYOLLA *et al.*, 2016; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2019). O padrão lipídico alterado na placenta e na prole, induz a metilação de genes promotores do desenvolvimento muscular, além de induzir o desenvolvimento mesenquimal e adiposo em detrimento da miogênese resultando em animais menores e mais pesados (PRATS-PUIG *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2013).

Devida a menor quantidade de mitocôndrias no tecido hepático fetal, e por consequência menor quantidade de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios, a capacidade de degradação desses substratos é praticamente nula. Sendo assim, o maior aporte de ácidos graxos, em especial no início do desenvolvimento pode produzir efeitos prejudiciais

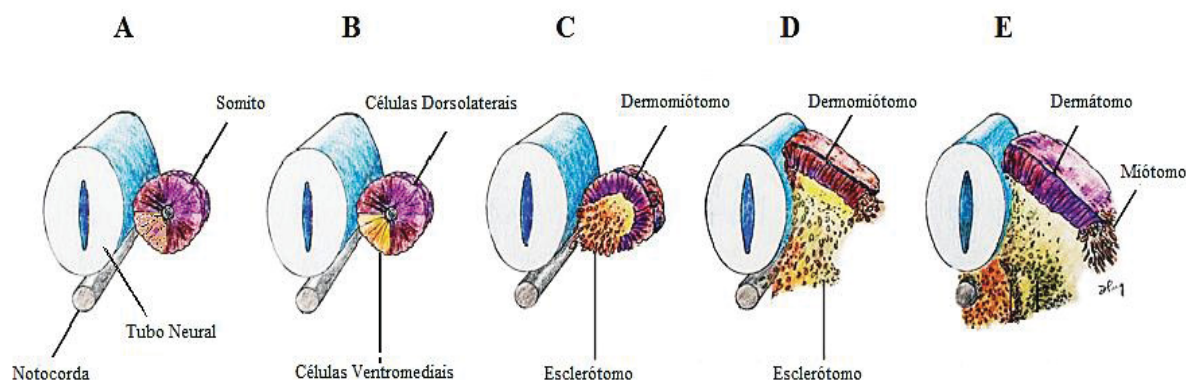
nas vias críticas que controlam a produção e armazenamento de energia e vias epigenéticas que conduzem ao excesso de adiposidade e a função mitocondrial alterada (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a, 2018b). Os efeitos lipotóxicos afetam também o tecido muscular, promovendo alterações na sensibilidade e metabolismo de glicose e consequentemente sobre a capacidade oxidativa das fibras musculares. Devida essa situação, tanto o fígado quanto os músculos são suscetíveis ao estresse oxidativo e danos decorrentes dessas alterações metabólicas (BOSMA, 2016; MEEH; BLAAK; VAN LOON, 2019; PARK; SEO, 2020)

2.4 MIOGÊNESE

O desenvolvimento muscular envolve uma série complexa de rearranjos morfogênicos acompanhados por expressão regulatória de circuitos genéticos específicos, processo denominado de miogênese. (ANDRIKOU; ARNONE, 2015; ENGEL; FRANZINI-ARMSTRONG, 1994; GALDINO, 2013). Em Vertebrata os músculos se originam da diferenciação de células do mesoderma paraxial, orientado paralelamente à notocorda e ao tubo neural em desenvolvimento, em estruturas segmentadas denominadas de somitos (ANDRIKOU; ARNONE, 2015; HOLLWAY, G.; CURRIE, 2005; SHAHJAHAN, 2015). A partir dos somitos são originadas diversas estruturas axiais, como as células cartilaginosas dos moldes das vértebras e costelas, os músculos estriados esqueléticos e a derme (WOLPERT *et al.*, 2000).

Durante o processo de formação dos somitos (Figura 9) ocorre uma primeira divisão inicial em duas porções, uma ventral e outra dorsal denominadas esclerótomo e dermomiótomo, respectivamente. O esclerótomo responsável pela formação das estruturas esqueléticas, enquanto o dermomiótomo após diferenciado em dermatomo e miótomo, responsáveis pela respectiva origem de estruturas dérmicas e musculares associadas ao tronco (ANDRIKOU; ARNONE, 2015; BUCKINGHAM; RIGBY, 2014; CURRIE; INGHAM, 2001). A sinalização inicial é dada pela expressão de genes, regulados paracrinamente e associados a produção de moléculas mediadoras e fatores de crescimento e diferenciação (ANDRIKOU; ARNONE, 2015; MANTOVANI, 2015).

Figura 9 - Representação esquemática do desenvolvimento embrionário do mesoderma paraxial

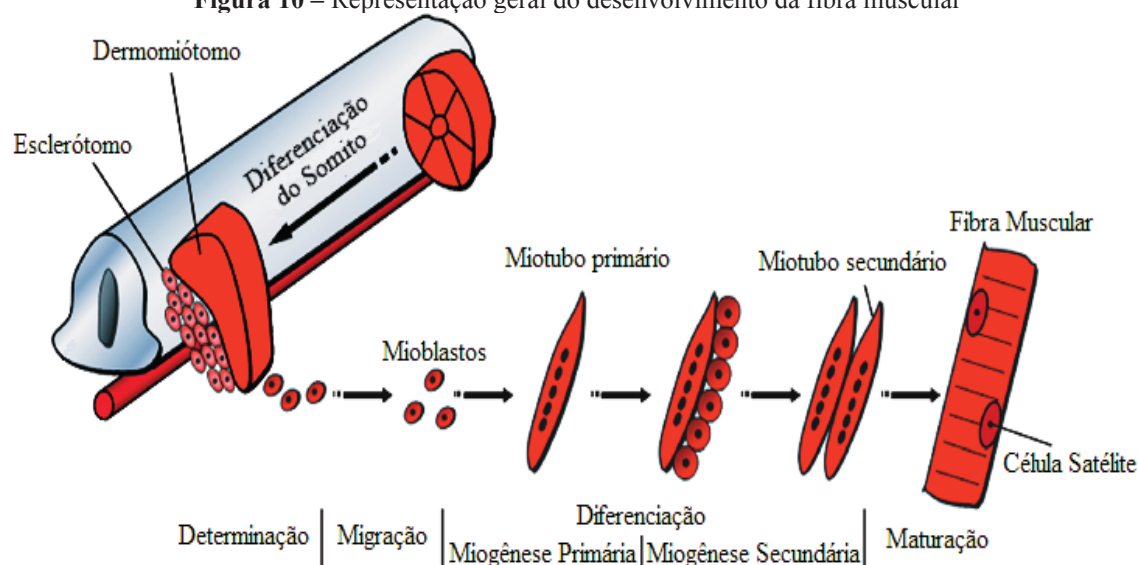


Legenda: Após o surgimento inicial dos somitos (A) ocorre um processo segregativo em duas populações celulares distintas (B), as quais dão origem a duas porções: dermomiótomo e esclerótomo (C). Após um curto processo de desenvolvimento dessas duas porções (D), ocorre a diferenciação do dermomiótomo: dermátomo e miótomo (E). Adaptado de PANG & THOMPSON, 2010.

O processo miogênico pode ser dividido em diferentes fases: proliferação, determinação, diferenciação e maturação das fibras musculares. A determinação é o momento no qual as células pluripotentes dos somitos se multiplicam e formam os mioblastos, ou células precursoras musculares (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). Durante a diferenciação os mioblastos se multiplicam e migram para locais determinados, sofrendo modificações estruturais originando os miotubos, que agrupados dão origem as primeiras fibras musculares (BUCKINGHAM *et al.*, 2003). Após essa fase, conhecida como miogênese primária, em diferentes populações musculares ocorre o início de uma segunda diferenciação, conhecida como miogênese secundária. Durante esse processo ocorre um incremento de fibras musculares e o desenvolvimento das células satélites, responsáveis pelo crescimento e reparo muscular (HOLLWAY, G. E.; CURRIE, 2003). (Figura 10).

Os fatores de crescimento e transcricionais expressos durante o processo de miogênese são os mesmos que ativam o início da atividade das células satélites durante processos de regeneração muscular (PAIXÃO, 2016). Essa redundância de mecanismos moleculares e morfológicos associados aos processos miogênicos e regenerativos podem ser utilizadas como base para estudos e progressos em campos de reparo muscular (HAWKE; GARRY, 2001; NEUPARTH, 2005). Além de fatores de indução e crescimento, algumas moléculas que inibem o desenvolvimento de mioblastos são comuns. A miostatina quando expressa está ligada com esse processo de regulação negativa, além de seu gene possuir regiões evolutivamente conservadas em diversas ordens de vertebrados, desde peixes Actinopterygii (MANTOVANI, 2015).

Figura 10 – Representação geral do desenvolvimento da fibra muscular



Legenda: Desenvolvimento da fibra muscular desde o processo de diferenciação e determinação nas células do somito, até a maturação final das fibras e células satélites. Adaptado de CHARRASSE *et al.*, 2003.

A regulação do desenvolvimento muscular é realizada pelos fatores de transcrição WNT, genes box pareados 3 (PAX3) e 7 (PAX7), além de fatores reguladores miogênicos (MRFs). A sinalização WNT é fundamental para a formação inicial do mesoderma paraxial, enquanto a expressão dos PAX3 e PAX7 nas células mesenquimais induz a expressão dos MRFs, levando ao início do programa miogênico (CABEÇO *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2010; SHAHJAHAN, 2015; ZHAO; HOFFMAN, 2004). Dentre os MRFs, Myf5 é o principal fator expresso no estágio inicial da miogênese, seguido pela expressão de MyoD, que induz a conversão das células precursoras nos mioblastos. Enquanto isso, a miogenina induz a diferenciação fusão dos mioblastos em miotubos, e segue sendo expressa durante todo o estágio fetal (DU *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2009).

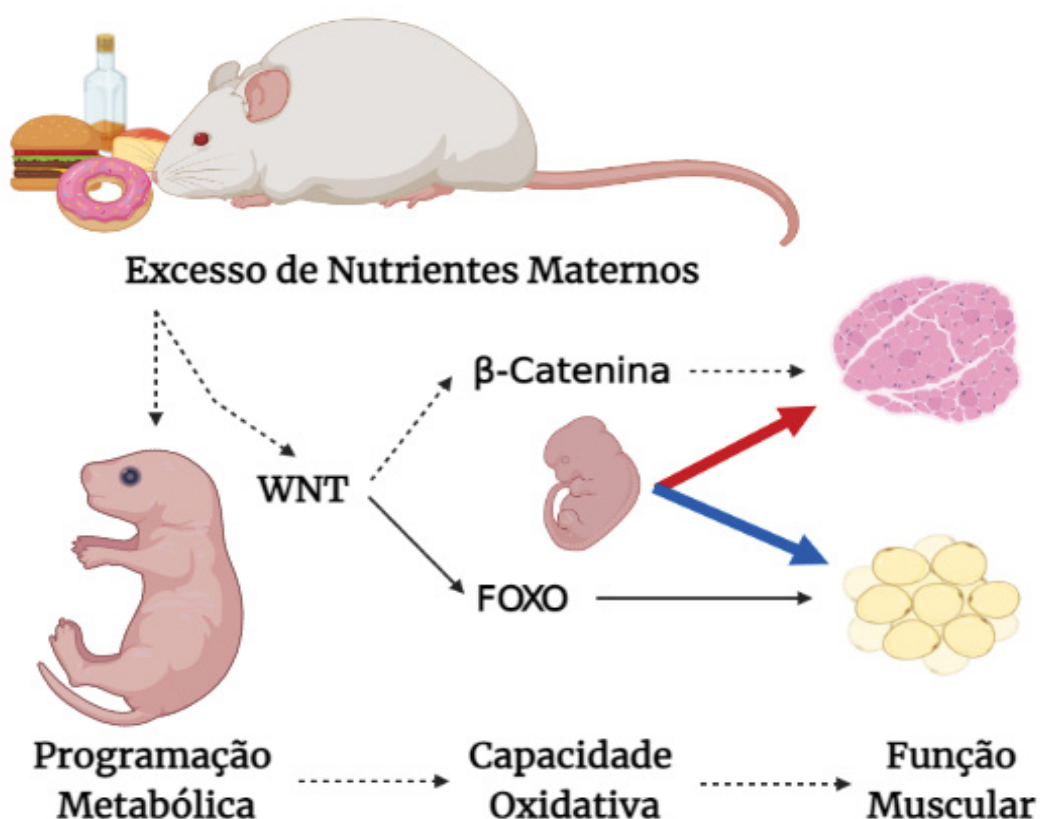
No entanto, como apenas uma pequena quantidade de fibras é formada no estágio embrionário, há pouca influência desse período sobre a condição muscular do animal adulto. Enquanto isso, o período de miogênese secundária é crucial para o desenvolvimento do músculo esquelético, sendo suscetível a estresses como o estado nutricional das progenitoras (DU *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2013). Já o desenvolvimento muscular pós natal está relacionado com a hipertrofia das miofibras, ocorrendo hiperplasia somente durante os processos regenerativos (DU *et al.*, 2010; SNIJDERS *et al.*, 2015; TONG *et al.*, 2009; WOSCZYNA; RANDO, 2018).

O excesso de nutrientes maternos durante o desenvolvimento muscular promove alterações importantes sobre a estrutura do tecido muscular (Figura 11), principalmente induzindo aumento da adipogênese e fibrogênese intramusculares (SHAHJAHAN, 2015;

TANG; LANE, 2012; VON MALTZAHN *et al.*, 2012). Em Boreoeutheria, a adipogênese tem início após a miogênese e se sobrepõe à fase fetal miogênica. Durante o desenvolvimento muscular, certa parte das células precursoras musculares sofre diferenciação em adipócitos e originam as gotículas lipídicas intramusculares (BOSMA, 2016; PARK; SEO, 2020; TONG *et al.*, 2009).

Devida a origem em comum do tecido muscular, adiposo e conjuntivo, os processos de regulação desses tecidos serem comuns e ocorrerem em um mesmo microambiente, todos são afetados pelas modificações epigenéticas nutricionais (PRATS-PUIG *et al.*, 2020). O aumento do aporte lipídico promove efeito competitivo, induzindo adipogênese e fibrogênese, comprometendo o desenvolvimento muscular. O aumento de gordura intramuscular pode induzir a redução da sensibilidade à insulina, comprometendo a função muscular e sua capacidade metabólica e oxidativa (BOSMA, 2016; CARTER; JUSTICE; THOMPSON, 2019; DU *et al.*, 2010; PARK; SEO, 2020).

Figura 11 - Representação esquemática geral do efeito do excesso de nutrientes sobre a via de sinalização WNT



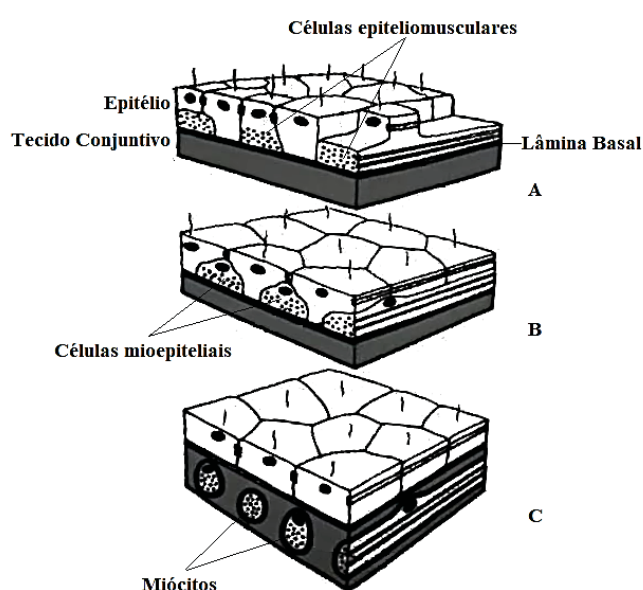
Legenda: Linhas pontilhadas e vermelha: efeito negativo; Linhas cheias e azul: efeito positivo. Esquema feito no BioRender.com com base em TONG *et al.* Maternal obesity downregulates myogenesis and β -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 296, n. 4, p. E917-E924, 2009.

2.5 TECIDO MUSCULAR

A movimentação através de contrações musculares é característica de todos os Animalia, mesmo os mais basais em que a principal força motora é gerada pelo batimento ciliar (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Possivelmente, o tecido muscular teve origem evolutiva do tecido epitelial (Figura 12) devido ao aumento da quantidade de proteínas que conferem a capacidade contrátil dessas células. Associada à compartimentalização e isolamento do tecido original, entretanto, o desenvolvimento de células musculares verdadeiras, de origem mesodérmica, ocorre a partir de animais triploblásticos (BURTON, 2008; MILLS; CANFIELD, 2014; SEIPEL; SCHMID, 2005).

É o tecido abundante na maioria dos Animalia (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016) podendo representar mais da metade do volume corporal nos Vertebrata (ROMER; PARSONS, 1985). Na maioria dos Bilateria existem duas populações musculares diferentes, classificadas conforme sua estrutura e propriedades funcionais: músculos estriados e não estriados (ANDRIKOU; ARNONE, 2015). Dentre os músculos estriados, podem ser subdivididos dois grupos, o músculo estriado esquelético ou somático e o músculo estriado cardíaco. Já os músculos não estriados, são conhecidos como músculos lisos ou viscerais (ANDRIKOU; ARNONE, 2015; HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Figura 12 - Representação das três categorias evolutivas de organização do tecido muscular

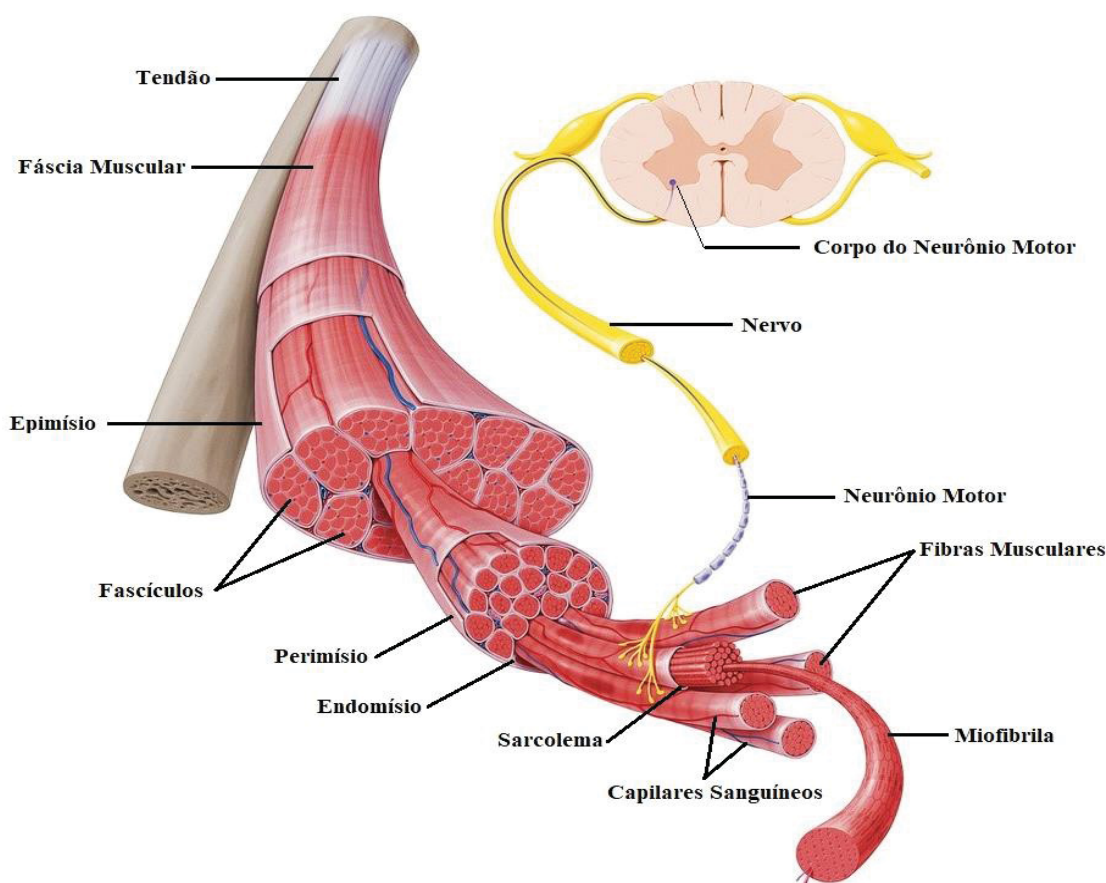


Legenda – As células epiteliomusculares (A) e as células mioepiteliais (B) são partes constituintes de um epitélio multifuncional, característico de filos mais basais de *Eumetazoa*. Em (C) os miócitos, revestidos tecido conjuntivo, formando um tecido à parte. Adaptado de RUPPERT; FOX; BARNES, 2005.

2.5.1 Estrutura

As fibras musculares esqueléticas são células alongadas, cilíndricas e com vários núcleos deslocados da região central em direção a periferia celular, imediatamente abaixo da membrana sarcoplasmática (Figura 13). O sarcoplasma, nomenclatura dada ao citoplasma dos miócitos, possui um citoesqueleto composto primordialmente por proteínas contráteis e elásticas. A expressão dessas proteínas alcança seu auge nessas células, e a sua organização em sarcômeros confere o estriamento característico desse tipo de tecido (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; PEREIRA, 2010). Graças a grande especialização para a capacidade de contração e relaxamento das células musculares, esse tecido está relacionado com diversas funções de respostas à estímulos e movimentos corporais. Porém, também estão relacionadas a funções secundárias, como manutenção da estabilidade corporal, proteção e suporte visceral, movimento de substâncias e atuação endócrina e metabólica (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; DÂNGELO; FATTINI, 2011).

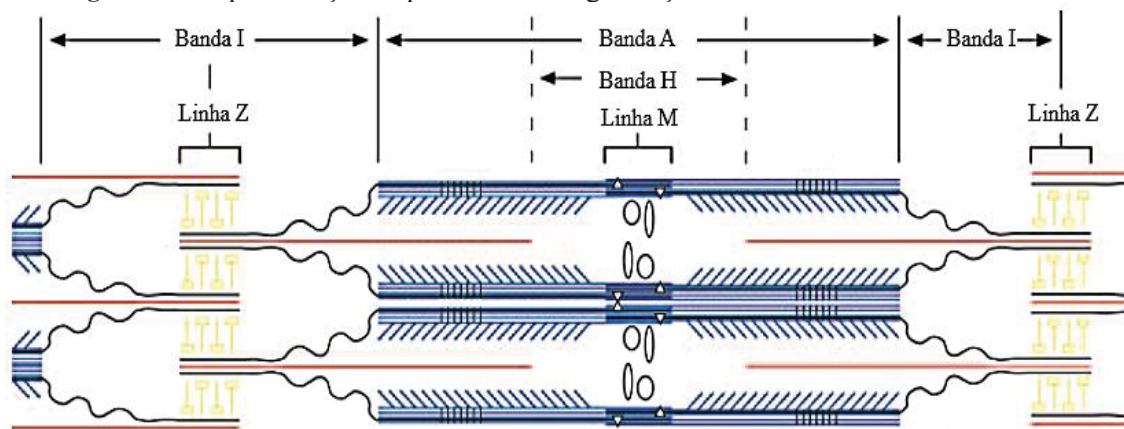
Figura 13 - Representação esquemática dos componentes do músculo estriado esquelético: seus envoltórios e compartimentalização; estruturas de vascularização e inervação



Fonte: Adaptado de <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/muscles>

As miofibrilas são as unidades funcionais das fibras musculares, compostas predominantemente por actina e miosina. A organização sérica desse conjunto de proteínas, conhecido como sarcômeros (Figura 14), confere a capacidade de encurtamento do músculo, e são estruturas amplamente conservadas em todos os vertebrados (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Duas Linhas Z delimitam um sarcômero, sendo formadas principalmente pela sobreposição de α -actina, titina e actina sendo o ponto de ancoragem desses filamentos. As regiões imediatamente próximas às Linhas Z, composta pela continuidade dos filamentos de actina é denominada de Banda I, sendo formada por actina e titina. Cada Hemi-Banda I, a partir da Linha Z central, se prolonga em direção a região mediana de um sarcômero. Os filamentos grossos, formados predominantemente por miosina, estão localizados medialmente nessas estruturas. A ancoragem desses filamentos se dá na região mediana conhecida como Linha M, e são interligadas por miomesina, proteína-M e esquelemina. A continuidade dos filamentos de miosina lateralmente forma a Banda H. O intervalo de sobreposição dos filamentos de actina e os de miosina é denominado de Banda A (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; HOOPER; THUMA, 2005).

Figura 14 - Representação esquemática da organização dos sarcômeros nos vertebrados

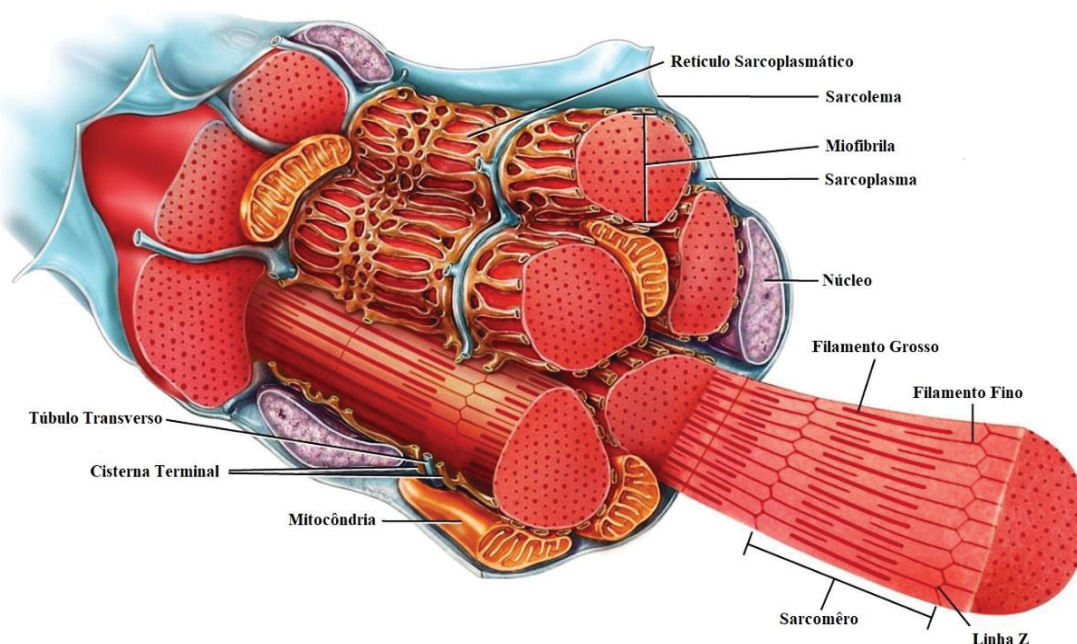


Legenda: filamentos grossos de miosina em azul; filamentos finos de actina em alaranjado. Proteínas associadas de fixação: em amarelo α -actina; em preto titina; os triângulos representando a titina dependente da atividade de quinase serina/treonina; os círculos sendo a proteína-M e as elipses a miomesina; associadas aos filamentos de miosina representadas pelas linhas, as proteínas C e H. Adaptado de HOOPER & THUMA, 2005.

Os filamentos finos, ou filamentos de actina são formados por uma dupla hélice polimerizada de monômeros de actina, envolvida por dois filamentos associados de troponina e tropomiosina, responsáveis pela regulação da contração muscular. Os filamentos grossos, ou filamentos de miosina são hexâmeros formados por duas cadeias pesadas em forma de α -hélice e quatro cadeias leves. Cada cadeia pesada pode ser separada em meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, globular com as regiões ligantes ao ATP e a actina (HOOPER; THUMA, 2005).

Além das miofibrilas, o sarcoplasma é constituído também pelas organelas comuns às outras células. O retículo endoplasmático liso, denominado de retículo sarcoplasmático, é formado por uma rede de vesículas arredondadas, achatadas e interligadas formando uma rede de tuneis especializados no armazenamento de íons de cálcio (Ca^{2+}). Os sarcotúbulos formados a partir dessa rede circundam individualmente todas as miofibrilas, seguindo em sua grande maioria paralelamente ao seu eixo longitudinal, emitindo projeções que as anastomosam. O sarcolema, ou membrana sarcoplasmática, é constituído por uma membrana basal rica em glicoproteínas e colágeno associada ao plasmalema. Invaginações do sarcolema formam os túbulos transversos, ou túbulos T, responsáveis pela contração uniforme das fibras musculares (Figura 15). A associação íntima de um túbulo T com duas cisternas adjacentes terminais do retículo formam a estrutura conhecida como tríade (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; OVALLE; HANIRNEY; NETTER, 2014; SOUZA; MEDRADO; GITIRANA, 2008)

Figura 15 - Representação esquemática dos componentes da célula muscular esquelética



Legenda: prolongamentos do sarcolema e especializações do retículo sarcoplasmático; organelas e organização das miofibrilas. Modificado de Copyright 2010, John Wiley & Sons, Inc. *Muscle Histology*.

A matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas que envolve as fibras musculares é estruturalmente ordenada e continua formando o tecido conjuntivo muscular, conferindo união, proteção e manutenção da funcionalidade das fibras e feixes musculares. Através desses envoltórios ocorre a interiorização de vasos sanguíneos e terminações nervosas, que respectivamente nutrem e inervam as células musculares em resposta a sua elevada demanda metabólica (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; GILLIES; LIEBER, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; OVALLE; HANIRNEY; NETTER, 2014).

Externamente, o tecido conjuntivo que recobre a totalidade de cada músculo esquelético é denominado epimísio. Finos septos, também de tecido conjuntivo nomeado de perimísio, partem em direção ao interior do músculo envolvendo e compartimentalizando fascículos, feixes ou grupamentos de fibras musculares. Envolvendo individualmente cada uma das fibras, há uma delgada bainha de tecido conjuntivo, o endomísio, formada pela lâmina basal e fibras reticulares associadas (GAO *et al.*, 2008b; GOSS, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; PURSLOW, 2002).

O endomísio é composto por basicamente três formas diferentes de colágeno: o tipo I consistindo de uma densa rede de fibras onduladas associadas diretamente sobre as fibras musculares; o tipo II representado por fibras perpendiculares ao eixo longitudinal das fibras, conferindo união dessas estruturas; o tipo III predominantemente formado por fibras reticulares adjacentes aos vasos sanguíneos. O perimísio possui uma série de camadas laminares onduladas de fibras colágenas formadas por compactos feixes dessas fibras. O epimísio é composto por duas camadas, ambas formadas por inúmeras camadas de fibras onduladas, internamente paralelas e externamente perpendiculares à fibra muscular (GAO *et al.*, 2008b, 2008a; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; PEREIRA, 2010).

A musculatura esquelética é constituída por diferentes tipos de fibras que apresentam características morfofuncionais distintas. Vários procedimentos foram adotados para a diferenciação dos tipos de fibras, e consequentemente, existem várias terminologias para classificar essas estruturas (MINAMOTO, 2005). A classificação amplamente adotada segue a caracterização histoquímica da atividade da enzima ATPase miofibrilar (mATPase), seguindo o padrão de resposta obtido as fibras foram classificadas em tipos I, IIA e IIB. Com a associação de reações histoquímicas com a atividade enzimática da mATPase e NADH tetrazólio redutase (NADH-TR), as fibras foram classificadas em fibras lentas oxidativas (SO - *slow oxidative*), fibras rápidas oxidativas e glicolíticas (FOG - *fast oxidative glycolytic*) e fibras rápidas glicolíticas (FG – *fast glycolytic*) (BROOKE; KAISER, 1970; PETER *et al.*, 1972).

Estudos envolvendo a microdissecação de fibras, associando a atividade da mATPase com técnicas de eletroforese, permitiram a detecção de quatro isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) presentes nas fibras musculares: fibras do tipo I, com MHCI; fibras do tipo IIA, com MHCIIa; fibras do tipo IIB, com MHCIIb; e fibras do tipo IID, com MHCIId (TERMIN; STARON; PETTE, 1989). A MHCIId está presente nos músculos de pequenos mamíferos e possui características intermediárias de contração entre as MHCIIa e MHCIIb. As

fibras do tipo IID apresentam características bioquímicas e histoquímicas similares as fibras IIX descritas para os Glires (*Rodentia* e *Lagomorpha*) (HAMALAINEN; PETTE, 1993; LARSSON *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 2001).

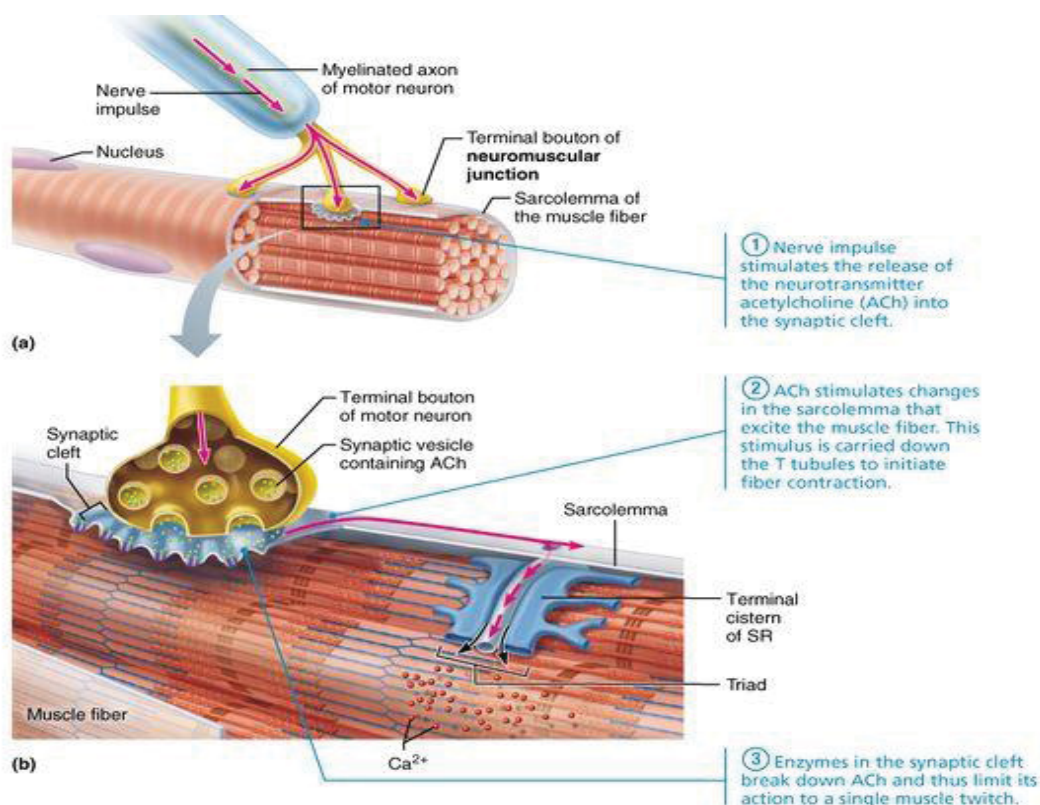
Os músculos estriados dos mamíferos, em sua grande maioria, são constituídos por uma população heterogênea de fibras, podendo apresentar um predomínio de um tipo específico (KUNZ, Regina Inês *et al.*, 2014; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). O músculo plantar apresenta populações consideráveis de todos os tipos de fibras musculares, atuando sobre a postura e manutenção do peso corporal em animais quadrúpedes (ARMSTRONG, 1984; FRISCHKNECHT; BELVERSTONE; VRBOVÁ, 1995). O músculo extensor longo dos dedos apresenta predominância de fibras tipo II, sendo responsável pela extensão dos dedos e estabilidade durante o balanço da marcha, enquanto o pé toca o chão (ARMSTRONG, 1984; TYČ; SŁAWIŃSKA; VRBOVÁ, 1999). Enquanto isso, o músculo sóleo apresenta predominância de fibras tipo I, sendo responsável juntamente com o plantar, pela estabilização do membro pélvico e da articulação talocrural (ARMSTRONG, 1984; KUNZ, R I *et al.*, 2013).

A atividade muscular é controlada por estímulos provenientes do sistema nervoso por meio de um neurônio motor. O corpo celular desse neurônio está localizado no corno anterior da medula espinal e se prolonga periféricamente por um axônio mielinizado. A ramificação desse axônio em contato com diversas células musculares forma uma unidade motora (Figura 13). Ao aproximar-se da fibra muscular, a fibra nervosa perde sua bainha de mielina, conservando apenas o neurilema (MACHADO, 2006). As regiões sinápticas localizadas entre os neurônios motores e as fibras musculares são denominadas de junções neuromusculares (JNMs) e são responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos (MARTYN; FAGERLUND; ERIKSSON, 2009). A exocitose do neurotransmissor acetilcolina (ACh) pelo terminal sináptico, é dada pela chegada do impulso nervoso. Quando a ACh, liberada na fenda sináptica, atinge a membrana pós-sináptica localizada na superfície da fibra muscular se inicia um potencial de ação que leva a contração muscular (KRAUSE NETO *et al.*, 2015; MARTYN; FAGERLUND; ERIKSSON, 2009; WALTON, 1988).

Quando a membrana sarcoplasmática é despolarizada pelo estímulo nervoso, canais de Ca^{2+} são abertos na parede das cisternas do retículo, levando a um influxo citoplasmático desses íons. A atuação do Ca^{2+} é diretamente sobre a troponina presente nos filamentos finos do sarcômero, permitindo a formação de pontes cruzadas entre a actina e a miosina. A contração deve-se pelo deslizamento dos filamentos finos e grossos uns sobre os outros, fornecendo um

encurtamento do sarcômero. Essa movimentação é levada pela presença do Ca^{2+} e de trifosfato de adenosina (ATP), o segundo atuando sobre a alteração conformacional da miosina durante o desligamento da actina. Imediatamente após a liberação do Ca^{2+} ocorre um bombeamento ativo desse íon novamente para o retículo sarcoplasmático, levando ao retorno da troponina para sua conformação inibitória dos sítios de ligação para a miosina (GUYTON; HALL, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SPENCE, 1991)

Figura 16 - Representação esquemática de uma junção neuromuscular e seus principais constituintes.



Legenda: **A:** Esquema geral da estrutura neural, juncional e muscular. **B:** esquema detalhado da atividade da junção neuromuscular e início da contração muscular Adaptado de <https://i.pinimg.com/564x/ae/f9/84/ae/f98414ee88529e1702ad30c3c37155.jpg>.

2.5.2 Metabolismo Energético

A glicose (Figura 17) é o principal substrato energético da maioria dos seres vivos, sendo que sua completa oxidação fornece uma quantidade considerável de energia livre, usada para gerar moléculas energéticas fundamentais para o funcionamento celular. Os Animalia de forma geral, armazenam glicose na forma de glicogênio, mantendo a osmolaridade celular baixa e liberando o substrato quando a demanda energética for aumentada. A degradação da glicose é denominada de glicólise, ocorrendo no citoplasma celular, sendo que esse processo preserva parte da energia livre na forma de ATP e NADH. A glicólise possui 10 etapas e é subdividida em duas fases, sendo as primeiras 5 etapas denominadas de fase preparatória, e as

próximas 5 etapas de fase de pagamento, todo esse processo origina duas moléculas de piruvato (ALBERTS *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2014).

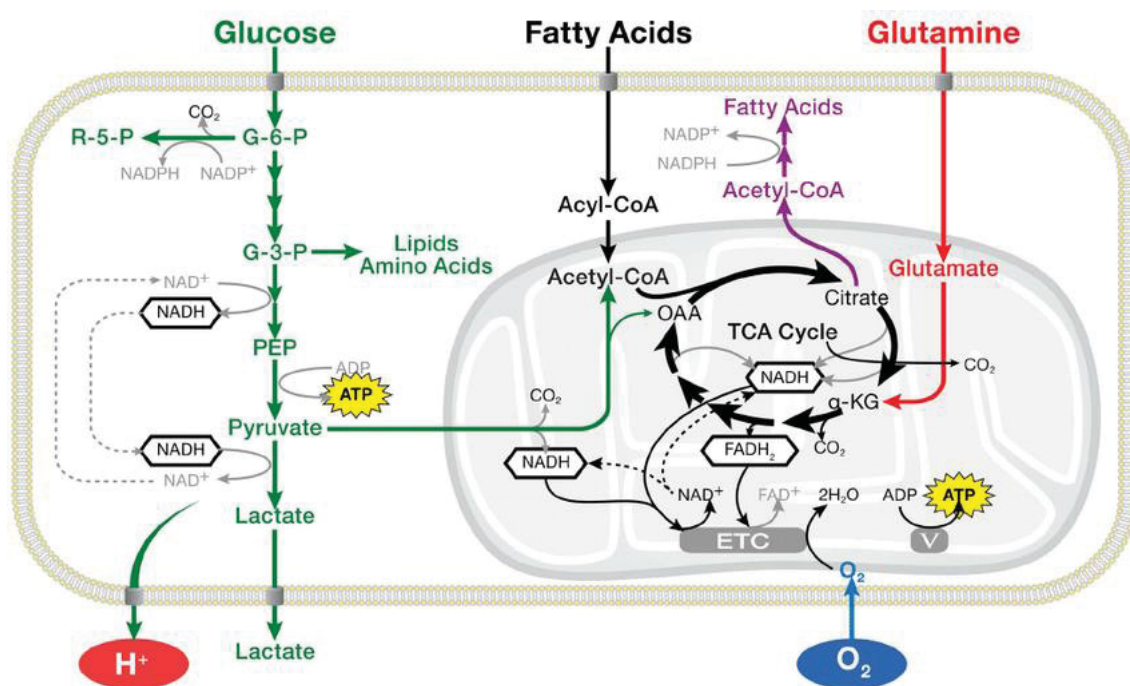
A primeira enzima da fase preparatória é a hexoquinase (HK) que catalisa a formação de glicose-6-fosfato, consumindo ATP. A glicose-6-fosfato segue a via de glicólise formando frutose-6-fosfato pela atuação da fosfoexose isomerase, mas também pode ser utilizada para a produção de pentoses, pela via das pentoses fosfato, originando ácidos nucléicos e coenzimas. A próxima enzima a atuar é a fosfofrutoquinase (PFK), utilizando a frutose-6-fosfato para a formação de frutose-1,6-bifosfato, que serve como substrato da aldolase para a geração de diidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. A diidroxiacetona-fosfato é isomerizada a gliceraldeído-3-fosfato pela triose-fosfato isomerase (ALBERTS *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2014).

As moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são oxidadas e fosforiladas na fase de pagamento pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase para a formação de 1,3-bifosfoglicerato. A enzima fosfoglicerato-quinase transfere um grupamento fosfato da 1,3-bifosfoglicerato para uma molécula de ADP, tendo como produto o ATP e 3-fosfoglicerato, que é convertido pela fosfoglicerato-mutase em 2-fosfoglicerato. A enzima enolase promove a desidratação do 2-fosfoglicerato, formando fosfoenolpiruvato que através da piruvato-quinase (PK) transfere um grupamento fosfato para outro ADP, tendo como produto ATP e piruvato (ALBERTS *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2014). As enzimas HK, PFK e PK são consideradas enzimas chave da glicólise por não promoverem atividade reversa e portanto, serem representativas da degradação de carboidratos (BALDWIN *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2005; LUVESQUE *et al.*, 2002).

O piruvato pode ser utilizado como substrato pela enzima lactato desidrogenase (LDH) para a produção de lactato, processo denominado de fermentação láctica. Essa atividade é a fase final do metabolismo anaeróbico, sendo considerada em excesso, como chave para a detecção de estresse celular derivado da hipóxia (MORGENSTERN *et al.*, 1965; NELSON; COX, 2014). Em condições aeróbicas, o piruvato é conduzido para a formação de acetil-CoA e dióxido de carbono, pela enzima piruvato desidrogenase (PDH) (PUTMAN *et al.*, 1993). A acetil-CoA é a molécula precursora do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo utilizada pela citrato sintase (CS) para a formação de citrato, tendo sua atividade regulada pela concentração de ATP e de acetil-CoA (SRERE, 1969).

O citrato formado é utilizado pela aconitase para a formação de isocitrato, que serve de substrato junto com o CO_2 para a isocitrato desidrogenase (IDH) para a formação de α -cetoglutarato e liberação de NADH e hidrogênio. As enzimas do complexo α -cetoglutarato desidrogenase promovem descarboxilação do α -cetoglutarato, produzindo succinil-CoA e NADH. A enzima succinil-CoA sintetase promove a formação de succinato através da degradação de succinil-CoA e síntese de dNTPs. O succinato é utilizado como substrato da succinato desidrogenase, formando fumarato e FADH. A fumarase, através da hidratação do fumarato, produz malato que é substrato da malato desidrogenase (MDH) para a recuperação de oxaloacetato (ALBERTS *et al.*, 2017; GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2014). As enzimas CS e MDH são enzimas chave do início e fim do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, enquanto a atividade da IDH pode indicar entrada de substratos proteicos no ciclo (CIARDIELLO *et al.*, 2000; KITTO, 1969; SRERE, 1969).

Figura 17 - Representação do metabolismo energético frente os três principais substratos metabólicos celulares, glicose, ácido graxo e aminoácidos



Fonte: <https://www.researchgate.net/Schematic-illustration-of-cellular-metabolism-pathways-along-with-assays-of-glucose.png>

A atividade das enzimas da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos são reguladas por vários fatores celulares, sendo que a condição energética mitocondrial e a quantidade dos substratos metabólicos e intermediários são as principais formas de regulação. Havendo excesso de acetil-CoA, a glicólise pode ser interrompida, o piruvato convertido em lactato e a acetil-CoA destinada para a síntese de ácidos graxos. Enquanto isso, em estados nutricionais

alterados, como a restrição nutricional, alguns aminoácidos podem ser utilizados para o fornecimento de energia, sendo que são encaminhados para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos como α -cetoglutarato. Da mesma forma, no excesso de lipídios, a β -oxidação fornece acetil-CoA para a atividade dos ciclo e produção de energia (BOSMA, 2016; CROS *et al.*, 1999; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; MASSCHELIN *et al.*, 2020; NELSON; COX, 2014; PARK; SEO, 2020).

2.5.3 Sistema Antioxidante

Durante a atividade metabólica celular, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, também conhecidas como radicais livres. Um radical livre é uma molécula química cuja a estrutura química apresenta pelo menos um átomo eletronicamente desemparelhado e, portanto, quimicamente instável. Como os átomos oxigênio e nitrogênio possuem alta eletronegatividade, ou seja, capacidade de promover reações químicas de oxirredução, as espécies reativas de nitrogênio e oxigênio são altamente reativas e promotoras de danos celulares. Devida a maior disponibilidade, ocorrem também mais moléculas reativas derivadas do oxigênio, que participam da regulação da funcionalidade celular normal e patológica (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014; DENNERY, 2007; MASSCHELIN *et al.*, 2020; WALRAND, 2018).

Ao longo do curso de atividade do metabolismo celular, principalmente na atividade da cadeia transportadora de elétrons (Figura 18), ocorre a redução parcial do oxigênio, formando moléculas como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de oxigênio (H_2O_2) e o íon hidroxila (HO^{\cdot}) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O aumento ou redução na geração de espécies reativas são importantes para a detecção de alterações metabólicas, caracterizando o estresse oxidativo por excesso ou por hipóxia (AHN *et al.*, 2019; NELSON; COX, 2014). Associado ao aumento da disponibilidade de oxigênio atmosférico e a sua utilização em processos metabólicos, o surgimento de mecanismos de proteção contra os danos oxidativos foi fundamental para o sucesso evolutivo dos Eukarya (KÜLTZ, 2020; ŚLESIAK *et al.*, 2016).

O sistema antioxidante é composto por moléculas enzimáticas e não enzimáticas, que atuam na metabolização das espécies reativas, minimizando a chance de ocorrência de danos oxidativos aos lipídios de membrana, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. As principais moléculas não enzimáticas são as vitaminas C e E, a glutatona e outros tióis, melatonina, compostos fenólicos e os carotenoides (BALDELLI *et al.*, 2019; GOULD; PAZDRO, 2019;

2.5.4 Acúmulo Lipídico no Tecido Muscular

O aumento da circulação de triacilgliceróis plasmáticos promove aumento da captação de ácidos graxos pelo tecido muscular, uma vez que é o tecido com grande importância no metabolismo de lipídios. Os ácidos graxos são armazenados nos músculos estriados em organelas derivadas de adipócitos, as gotículas lipídicas intramusculares, que armazenam e fornecem lipídios para o metabolismo muscular conforme há necessidade energética (BOSMA, 2016). No entanto, o aumento da disponibilidade e do acúmulo lipídico pode causar alterações metabólicas importantes para o tecido muscular (ESTADELLA *et al.*, 2013; SHRESTHA *et al.*, 2020b, 2020a).

A presença de moléculas lipídicas em excesso promove indução da β -oxidação e inicialmente promove aumento da atividade de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TURNER *et al.*, 2007), no entanto o excesso de diacilglicerol e ceramida formados durante esse processo induzem o aumento do processo inflamatório localizado (TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016). A alteração metabólica decorrente do aumento lipídico promove mudança nos padrões de atividade muscular, sendo considerado um efeito tóxico similar a alguns xenobióticos (MEEX; BLAAK; VAN LOON, 2019). O efeito lipotóxico induz a redução da capacidade oxidativa muscular, promovendo redução no consumo de glicose, aumento da lipogênese e β -oxidação a longo prazo. Como consequência do desbalanço metabólico, as mitocôndrias aumentam a geração de EROS e acumulam danos oxidativos, reduzindo ainda mais a capacidade oxidativa (ECKARDT; TAUBE; ECKEL, 2011; GOMES *et al.*, 2018; PARK; SEO, 2020).

Induzido pelo aumento das EROS, do processo inflamatório e dos danos celulares decorrentes de ambos, as células satélites são induzidas ao processo de reparo muscular. No entanto, o estado metabólico instaurado promove redução na expressão de β -catenina e aumento da expressão de FOXO, induzindo as fibras oxidativas a transicionarem metabolicamente (DU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017; TONG *et al.*, 2009). Além de promover a redução da expressão de vias relacionadas com a síntese proteica, como a mTOR (PARK; SEO, 2020). Todas essas alterações metabólicas e estruturais influenciadas pela lipotoxicidade muscular são característica de modelos de obesidade e excesso lipídico, independente da fase de vida, além de serem sinais do processo de envelhecimento metabólico e resistência à insulina (MEEX; BLAAK; VAN LOON, 2019; SHRESTHA *et al.*, 2020b; TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos utilizados nesse estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob o número 1303/2019.

3.1 ANIMAIS

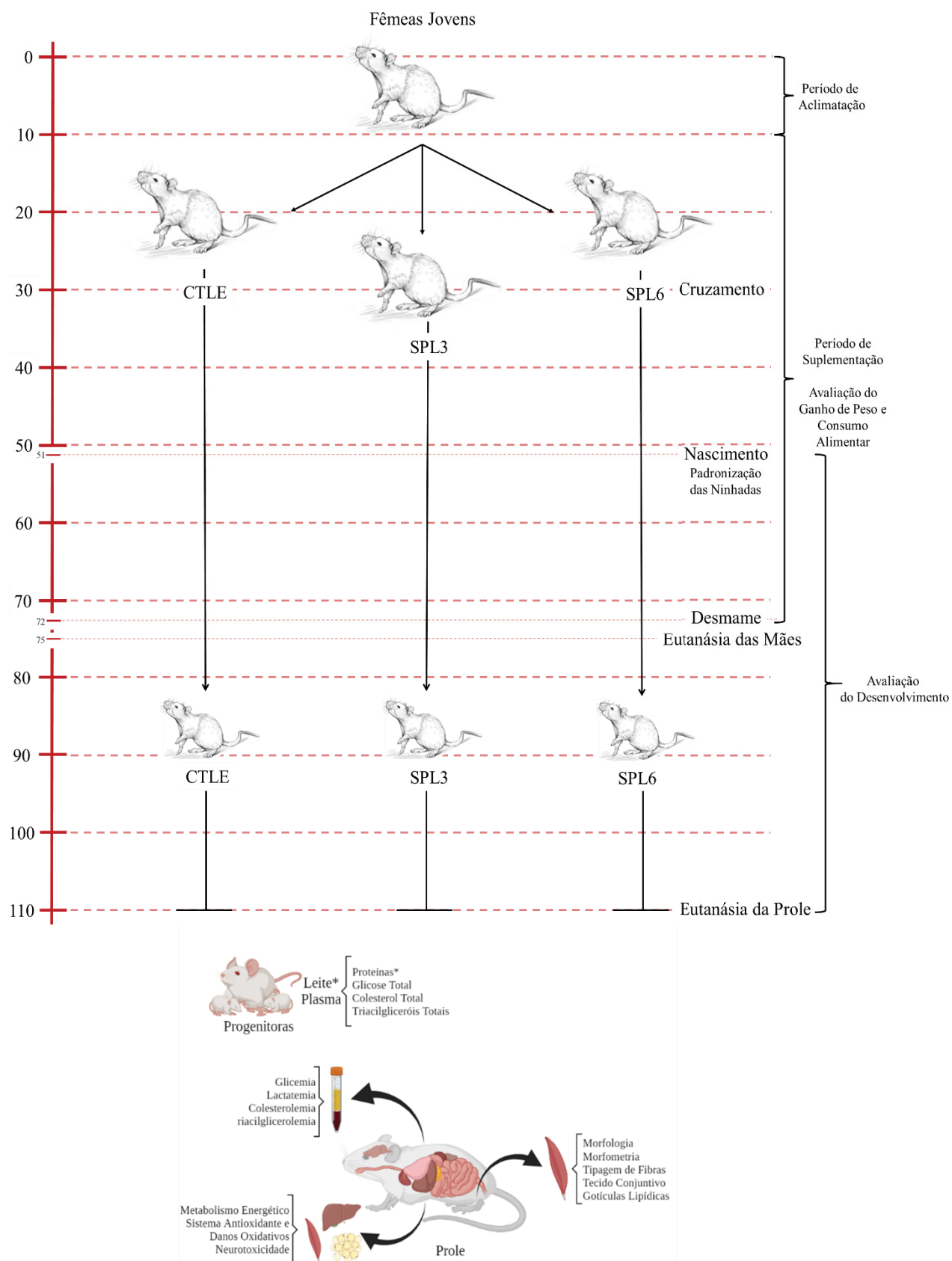
Para o presente estudo foram utilizadas 30 ratas da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 60 dias de vida, obtidas do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em ambiente controlado sob fotoperíodo de 12h; temperatura de 22 ± 2 °C; água e ração *ad libitum*. Após dez dias de aclimação, as ratas foram distribuídas em três grupos experimentais, assumindo-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) (Figura 1):

- Grupo Controle (CTLE): composto por fêmeas que não receberam nenhuma suplementação;
- Grupo Suplementado com AGPIs ω -3 (SPL3): composto por fêmeas que foram suplementadas diariamente durante toda a gestação e lactação com a dose de 4,0 g / kg de composto de extratos marinhos, rico em ácidos graxos ω -3;
- Grupo Suplementado com AGPIs ω -6 (SPL6): composto por fêmeas que foram suplementadas diariamente durante toda a gestação e lactação com a dose de 4,0 g/ kg de composto de extratos vegetais, rico em ácidos graxos ω -6.

O volume de óleo correspondente ao peso corporal de cada animal, foi fornecido diariamente por via oral com auxílio de pipeta de volume regulável, iniciando três semanas antes do acasalamento para evitar estresse e problemas com a implantação embrionária das ratas.

Após 21 dias de experimento, as ratas dos três grupos foram colocadas para acasalamento com machos *Wistar* não suplementados na proporção de 3 fêmeas para cada macho. Durante toda a fase de acasalamento, gestação e lactação foram mantidas as respectivas suplementações, a fim de garantir a transferência dos AGPIs aos fetos em desenvolvimento pela circulação placentária e pelo leite. Após o desmame, os filhotes foram mantidos sem suplementação até os 60 dias de vida, quando foram eutanasiados.

Figura 19 - Esquema do delineamento experimental



Legenda: CTLE: fêmeas controle; SPL3: fêmeas suplementadas com ácidos graxos ricos em ω -3; SPL6: fêmeas suplementadas com ácidos graxos ricos em ω -6. Fonte: do autor.

O consumo alimentar e o ganho de peso das progenitoras foram acompanhados durante todo o experimento. No dia do nascimento das proles, foram quantificados os números de nascimentos e de natimortos, posteriormente todas as ninhadas foram padronizadas para o número de oito filhotes, sendo quatro machos e quatro fêmeas, garantindo os mesmos padrões de disponibilidade de leite para todos os filhotes. Após a padronização, as ninhadas foram pesadas e o ganho de peso acompanhado duas vezes na semana até o desmame. No 14º dia pós-natal, os animais foram pesados, o comprimento nasoanal foi mensurado e ambos utilizados para o cálculo do Índice de Lee (LEE, J.; KOH; ONG, 1989). Após o desmame, o peso corporal e o comprimento nasoanal foram mensurados quinzenalmente até o dia da eutanásia.

3.2 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL

3.2.1 Progenitoras

Após o desmame, as progenitoras foram mantidas em repouso por 12h para a produção normal de leite, sendo posteriormente anestesiadas intraperitonealmente com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Para estimular a ordenha, foi administrado intraperitonealmente ocitocina sintética (20 U/kg). O leite coletado foi armazenado em ultrafreezer para posterior análise bioquímica.

Após 24h da coleta de leite, as fêmeas foram pesadas e eutanasiadas por decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados em temperatura ambiente a 1.800 RCF (g) por 10 minutos para a obtenção do plasma para posterior análise bioquímica. O fígado e os tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal foram coletados, pesados e padronizados por 100 g de peso corporal.

3.2.2 Prole

Aos 60 dias de vida, as proles foram pesadas e eutanasiadas por decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados conforme descrito anteriormente, para a obtenção do plasma para posterior análise bioquímica. O fígado (FIG), os tecidos adiposos mesentérico (MESEN) e retroperitoneal (RETRO) foram coletados, pesados e padronizados por 100 g de peso corporal. Os músculos sóleo (SOL), extensor longo dos dedos (EDL) e plantar (PLAN) foram dissecados, tiveram o comprimento e peso mensurados, e os pesos foram padronizados por 100 g de peso corporal. Posteriormente, todo material biológico foi acondicionado em microtubos e mantidos congelados a -80°C até o momento das análises.

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Perfil Bioquímico do Leite e do Plasma

O leite coletado foi diluído (1:20 v/v) em solução de NaCl 0,9 M (GOMES *et al.*, 2018) para as análises de proteínas solúveis, glicose, colesterol total e triacilgliceróis totais. A dosagem de proteínas solúveis foi realizada por meio do método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão e os valores expressos em $\mu\text{g/mL}$ (BRADFORD, 1976). Os demais parâmetros foram quantificados por meio de kits comerciais de análise colorimétrica e os valores expressos em mg/dL (Vida Biotecnologia®).

O plasma de todos os animais foi destinado para a dosagem das variáveis séricas de glicose, colesterol total e triacilgliceróis totais através de kits comerciais de análise colorimétrica (Vida Biotecnologia®). Além disso, o plasma da prole foi utilizado para a dosagem do colesterol HDL e lactato através de kits comerciais de análise colorimétrica (Vida Biotecnologia®). Com os valores de colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis foram realizados os cálculos para se estimar colesterol LDL e VLDL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO SERIES TECAN) e os valores expressos em mg/dL .

3.3.2 Metabolismo Energético de Carboidratos e Proteínas

Os músculos sóleo e extensor longo dos dedos, e o fígado foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em banho de gelo. Posteriormente, os homogenatos foram sonicados durante 20 segundos para o rompimento das membranas intracelulares e centrifugados a 12.000 RCF (g) a 4 °C durante 10 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação das atividades enzimáticas. Para padronização, foi realizada a dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford com curva padrão de albumina de soro bovino (BRADFORD, 1976), posteriormente todas as amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl pH 7,4 (1:20 v/v para os músculos e 1:40 v/v para o fígado), para manter a concentração proteica abaixo de 1 mg/dL , possibilitando maior tempo de linearidade das reações.

A atividade enzimática da hexoquinase (HK – EC 2.7.1.1) foi determinada por meio da produção de glicose-6-fosfato a partir do consumo de glicose e ATP, o aumento de absorbância pela redução de NADP^+ foi monitorado em 343 nm (Sistema de Reação (SR): 50 mM de tampão Imidazol pH 7,4; 2 mM de glicose; 2 mM de ATP; 10 mM de MgCl_2 ; 400 μM de

NADP⁺; 1 mM de ditionitritol; 2 mM de KCl; 0,3 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em nM de NADP⁺ reduzido.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (BALDWIN *et al.*, 2007).

A atividade enzimática da piruvato quinase (PK – EC 2.7.1.40) foi determinada por meio da produção de piruvato e ATP a partir do consumo de fosfoenolpiruvato (PEP). A redução da absorbância pela oxidação do NADH foi acompanhada em 343 nm (SR: 50 mM de tampão Imidazol pH 7,4; 10 mM de MgCl₂; 25 mM de KCl; 150 µM de NADH; 5 mM de ADP; 5 mM de PEP; 9 U/mL de lactato desidrogenase). Os valores foram expressos em nM de NADH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (LUVESQUE *et al.*, 2002).

A atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH – EC 1.1.1.27) foi determinada por meio da produção de lactato a partir do consumo de piruvato, sendo a redução da absorbância avaliada pela oxidação do NADH, acompanhada em 343 nm (SR: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de piruvato de sódio; 100 mM de KCl; 254 µM de NADH). Os valores foram expressos em nM de NADH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005).

A atividade enzimática da citrato sintase (CS – EC 2.3.3.16) foi determinada por meio da produção de citrato e coenzima A (CoA) a partir do consumo de oxaloacetato e acetil-CoA, sendo o aumento da absorbância pela formação do complexo CoA e DTNB avaliado a 412 nm (SR: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de KCl; 1 mM EDTA; 200 µM de DTNB; 200 µM de acetil-CoA; 500 µM de oxaloacetato). Os valores foram expressos em nM de CoA-SH .min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002).

A atividade enzimática da malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37) foi determinada por meio da produção de malato a partir do consumo de oxaloacetato, sendo a redução da absorbância avaliada pela oxidação do NADH em 343 nm (SR: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4; 400 µM de oxaloacetato; 20 mM de MgCl₂; 155 µM de NADH). Os valores foram expressos em nM de NADH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (CHILDRESS; SOMERO, 1979).

A atividade enzimática da glutamato desidrogenase (GLDH – EC 1.4.1.2) foi determinada por meio da produção de α-cetoglutarato a partir do consumo de glutamato, sendo o aumento da absorbância avaliado pela redução do NAD⁺ em 343 nm (SR: 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4; 2 mM de NAD⁺; 800 µM de ADP; 40 mM de l-glutamato). Os valores foram expressos em µM de NAD⁺ reduzido.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (BIDIGARE; FREDERIC; KING,

1981; CIARDIELLO, M. A. *et al.*, 2000).

A atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST – EC 2.6.1.1) foi determinada por meio da produção de malato pela MDH do SR, avaliando-se o consumo do oxaloacetato produzido a partir do consumo de α -cetoglutarato e aspartato. A redução da absorbância pela oxidação do NADH foi acompanhada em 343 nm. Os valores foram expressos em mM NADH oxidado.min⁻¹.mg proteína⁻¹ (SR: kit comercial Bioclin®).

A atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT – EC 2.6.1.2) foi determinada por meio da produção de lactato pela LDH do SR, avaliando-se o consumo do piruvato produzido a partir do consumo de α -cetoglutarato e alanina. A redução da absorbância pela oxidação do NADH foi acompanhada a 343 nm. Os valores foram expressos em mM NADH oxidado.min⁻¹.mg proteína⁻¹ (SR: kit comercial Bioclin®).

A atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP – EC 3.1.3.1) foi determinada por meio da produção de p-nitrofenol e 2-amino-2-metil-1-propanol-fosfato, avaliando-se a transferência do grupamento fosfato do substrato p-nitrofenilfosfato para o 2-amino-2-metil-1-propanol do SR. O aumento da absorbância pela produção do p-nitrofenol foi acompanhada a 405 nm. Os valores foram expressos em mM p-Nitrofenol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ (SR: kit comercial Bioclin®).

3.3.3 Sistema Antioxidante

Os músculos sóleo e extensor longo dos dedos, o fígado, e os tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em banho de gelo e centrifugados a 12.000 RCF (g) a 4 °C durante 20 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação das atividades enzimáticas. Para padronização, foi realizada a dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford com curva padrão de albumina de soro bovino (BRADFORD, 1976), posteriormente todas as amostras foram padronizadas para 1 mg de proteína.

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) foi determinada através da inibição da formação de azul de formazan a partir da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), o aumento da absorbância pela redução do NBT pelo ânion superóxido foi acompanhado a 560 nm (SR: 182 mM de tampão carbonato de sódio pH 10,2; 50 μ M de EDTA; 100 μ M de NBT; 36,86 mM de sulfato de hidroxilamida). Os valores foram expressos

em U x mg de proteína⁻¹ (CROUCH *et al.*, 1981).

A atividade enzimática da catalase (CAT – EC 1.11.1.6) foi determinada através da formação de H₂O e O₂ a partir do consumo de H₂O₂, a redução da absorbância pelo consumo do H₂O₂ foi acompanhada a 240 nm (SR: 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 10 mM de H₂O₂). Os valores foram expressos em mM de H₂O₂ consumido x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹ (AEBI, 1985).

A atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST – EC 2.5.1.18) foi determinada através da formação de um tioéter a partir da interação da GSH com o CDNB, o aumento da absorbância pela formação do tioéter foi acompanhado a 340 nm (SR: 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5; 1,5 mM de GSH; 2 mM CDNB). Os valores foram expressos em μM de tioéter formado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹ (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

A atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx – EC 1.11.1.9) foi determinada através da formação de GSSG a partir da redução da GSH no consumo de H₂O₂, a redução da absorbância pela oxidação do NADPH foi acompanhada a 340 nm (SR: 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 2 mM de azida sódica; 200 μM de NADPH; 2 mM de GSH; 1 U/mL de GR; 500 μM de H₂O₂). Os valores foram expressos em μM de NADPH oxidado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹ (WENDELL, 1981).

A atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – EC 1.1.1.49) foi determinada pela formação de NADPH a partir do consumo de glicose-6-fosfato, o aumento da absorbância pela redução do NADP⁺ foi acompanhado a 340 nm (SR: 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de glicose-6-fosfato; 200 μM de NADP⁺). Os valores foram expressos em μM de NADP⁺ reduzido x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹ (CIARDIELLO, M.; CAMARDELLA; DI PRISCO, 1995).

2.3.4 Índices de Estresse Oxidativo e Neurotoxicidade

A concentração de GSH e de outros tióis não proteicos (NP-SH) foram determinadas através da interação dos tióis com o DTNB e formação de um cromóforo amarelado. Para a realização do ensaio foi necessária a precipitação das proteínas da amostra pela adição de TCA 30% (1:5 v/v) e centrifugação a 7000 RCF (g) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos tióis com a adição de 250 μM de DTNB e a absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 415 nm. Os valores foram expressos em nM de tióis.mg

proteína⁻¹ (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi determinado pela geração de malondialdeído (MDA) pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e geração de um cromóforo e também pela geração de complexos entre Fe⁺² e xilenol laranja e formação de um cromóforo estabilizado por hidroxitolueno butilado. A absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 535 nm e 560 nm, respectivamente. Os valores foram expressos em nM hidroperóxidos. mg de proteína⁻¹ (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

A atividade enzimática da colinesterase total (ChE – EC 3.1.1.8) foi determinada pela geração do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina a partir da interação da tiocolina e do DTNB, o aumento da absorbância pela formação do cromóforo foi acompanhado a 405 nm (SR: 487 µM de DTNB; 2,25 mM de iodeto de acetiltiocolina). Os valores foram expressos em nM de acetiltiocolina hidrolizados.min⁻¹.mg proteína⁻¹ (ELLMANN *et al.*, 1961).

3.4 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

O antímero direito do músculo plantar foi dissecado e seccionado transversalmente na porção média do ventre muscular. A porção proximal foi deixada à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos, envolta em talco neutro para crioproteção, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer (-80°C). A porção distal foi fixada em solução de Metacarn (Metanol, Clorofórmio e Ácido Acético Glacial) por 24 h e armazenados em álcool 70% até o momento do processamento histológico (PUCHTLER *et al.*, 1970).

3.4.1 Análises Histológicas

As porções proximais dos músculos plantares armazenadas em ultrafreezer foram transferidas para a câmara de criostato a -25 °C, fixadas às platinas com o composto Tissue-Tek® O.C.T e mantidas até a cristalização do meio. Posteriormente foram realizadas secções transversais de 7 µm dos músculos, fixadas em lâminas de vidro e destinadas para as técnicas de Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e Sudan Black (LEACH, 1934). A porção distal dos músculos plantares armazenadas em álcool 70% foram desidratadas em série crescente de álcoois, diafanizadas com álcool n-butilico (ZAZULA *et al.*, 2020) e incluídas em parafina histológica. Posteriormente foram realizadas secções transversais de 7 µm dos músculos em micrótomo de Minot, fixadas em lâminas de vidro e destinadas para a técnica de Sírius Red (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

Para cada técnica, foram obtidas 12 imagens de cada lâmina em objetiva de 40x com o auxílio de microscópio (Carl Zeiss™ Primo Star™) com câmera acoplada (Carl Zeiss™ AxioCam ERc 5s) no programa ZEN 3.1 (Carl Zeiss™).

As fotomicrografias com a coloração de hematoxilina e eosina foram destinadas para a descrição morfológica e morfometria do tecido muscular. Foram analisadas a organização do tecido, disposição e formato das fibras musculares e também a posição dos núcleos. Para as análises morfométricas, foi realizada a mensuração da área de cada fotomicrografia e todas as células que apareciam parcialmente no campo foram desconsideradas. Sendo assim, foram quantificadas as fibras musculares, os núcleos periféricos e centralizados e os capilares sanguíneos. Também foram mensuradas a área e os diâmetros maior e menor das fibras musculares e a área dos núcleos. Para realização das análises foi empregado o programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc. ®).

Com os valores da área total mensurada e o número de fibras musculares quantificadas foi calculada a densidade de fibras por mm² (*Densidade = nº de fibras / área mensurada*). A partir do número de núcleos, capilares e fibras foram calculadas as razões de núcleos (*Núcleo/Fibra = nº de núcleos totais / nº de fibras*) e capilares (*Capilar/Fibra = nº de capilares / nº de fibras*) por fibra. Os valores da razão de núcleos por fibras foram utilizados para o cálculo da razão de área de núcleo por citoplasma (*Área Núcleo/Citoplasma = (NF x Área Núcleo) / Área Fibra*).

2.4.2 Análises Histoenzimológicas

As porções proximais dos músculos plantares armazenadas em ultrafreezer foi transferida para a câmara de criostato a -25 °C, fixadas às platinas com o composto Tissue-Tek® O.C.T e mantidas até a cristalização do meio. Posteriormente foram realizadas secções transversais de 7 µm dos músculos, fixadas em lâminas de vidro e destinadas para a técnica de NADH-TR para a tipagem de fibras (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). Foram obtidas 6 imagens de cada lâmina em objetiva de 10x com o auxílio de microscópio (Carl Zeiss™ Primo Star™) com câmera acoplada (Carl Zeiss™ AxioCam ERc 5s) no programa ZEN 3.1 (Carl Zeiss™). As fotomicrografias foram utilizadas para a tipagem de fibras, que foi realizada por meio da contagem total de células inteiras de cada imagem e diferenciação por meio da intensidade de coloração da reação. A área e os diâmetros maior e menor foram mensurados em 50 fibras de cada tipo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos por média \pm desvio padrão e analisados por meio da estatística descritiva e inferencial no programa R versão 4.0.3 (R Core Team, 2020). A avaliação dos nascimentos e ocorrência de natimortos foram comparadas pelo Teste de Qui-Quadrado de Aderência. Para a escolha dos demais testes estatísticos relativos às variáveis quantitativas, os dados foram avaliados quanto a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Bartlett). Os valores referentes aos dados ao longo do tempo foram avaliados pelo Teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido do pós-teste Tukey-HSD. Os demais dados foram avaliados pelo Teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey-HSD. Em caso de dados não paramétricos, o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

As matrizes das variáveis relativas aos, Variáveis Corporais da Gestação, Variáveis Corporais ao Desmame, Perfil Bioquímico Plasmáticos, Perfil Bioquímico do Leite, Variáveis de Desenvolvimento, Variáveis Corporais, Perfil Bioquímico do Plasma, Características Mesenquimais, Características Musculares, Atividade Bioquímica Hepática, Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos, Caracterização dos Tipos de Fibras, Distribuição Capilar e Nuclear, Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Sóleo, Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos, Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Sóleo, Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Extensor Longo dos Dedos, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo e Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos foram estandarizadas e analisadas por meio da análise de componentes principais (PCA). Na análise de componentes principais são definidas as cargas fatoriais, as quais são definidas como as correlações de cada variável com a composição do fator, sendo o fator uma nova variável estatística definida pelo conjunto das cargas fatoriais. As cargas fatoriais resultantes dos componentes principais foram avaliadas quanto sua significância por meio de Análise da Variância Fator Único, assumindo como fator fixo os grupos experimentais com pós teste de Tukey-HSD.

A construção de modelos explicativos dos aspectos relativos aos efeitos do uso de suplementos ômega na prole foi realizada por meio de Equações Estruturais (Structural equations models). Nesta análise sugere-se que os sistemas (matrizes de variáveis listadas acima) apresentem indicadores associados, e que o conjunto destes sistemas possibilite a caracterização de um determinado efeito sobre a prole de mães suplementadas com os AGPIs

O método utilizado para a estimação dos parâmetros dos diferentes caminhos do modelo foi a máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), o qual forneceu estimativas dos coeficientes estandarizados, o desvio padrão, o valor crítico de Z e o p-valor. O ajustamento do modelo foi avaliado por meio de parâmetros de ajuste, entre eles: RMSEA, SRMR, CFI (MAROCO, 2010).

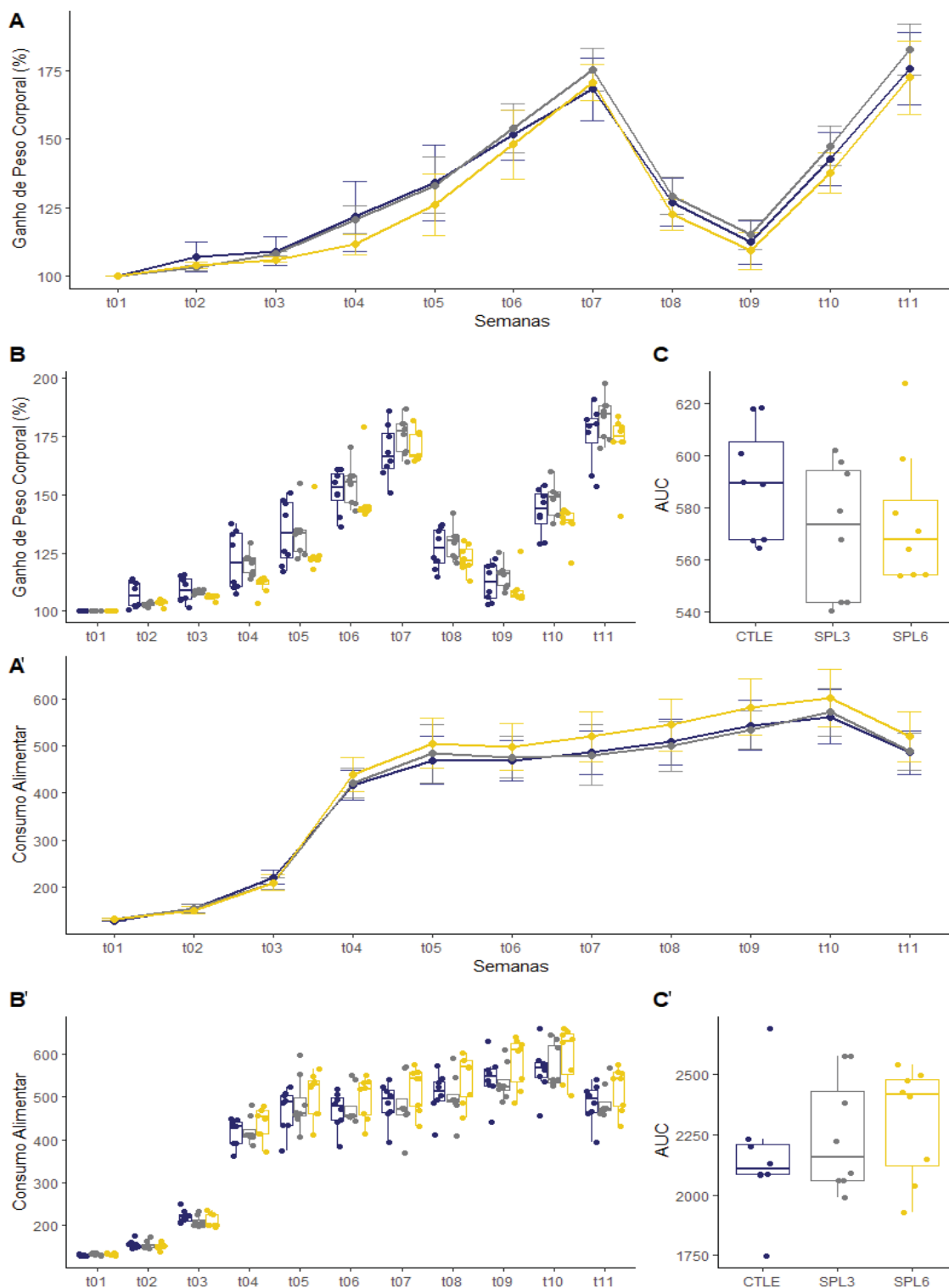
4.0 RESULTADOS

4.1 PROGENITORAS

O ganho de peso corporal e o consumo alimentar das progenitoras foi acompanhado durante as 12 semanas experimentais. A análise do ganho de peso corporal percentual (Figura 20A e B) dessas fêmeas, indicou que não houve diferença de ganho de peso entre os grupos ($F_{2,20} = 0,3463$; $p = 0,7141$), sendo que todas as progenitoras ganharam peso de forma similar ao longo das semanas experimentais ($F_{21,210} = 217,1192$; $p < 0,0001$; $F_{21,210} = 1,8837$; $p = 0,0006$, respectivamente). Da mesma forma, não houve diferença no ganho total de peso entre os grupos ($F_{2,21} = 1,2429$; $p = 0,3089$; Figura 20C).

Tratando-se do consumo alimentar (Figura 20A' e B') não houve diferença entre os tratamentos e tão pouco dos tratamentos ao longo do tempo ($F_{2,20} = 0,4234$; $p = 0,6642$; $F_{21,210} = 0,9927$; $p = 0,4930$, respectivamente) e de forma semelhante somente o aumento do consumo alimentar ao longo do tempo foi diferente ($F_{21,210} = 568,8326$; $p < 0,0001$). Da mesma forma, não houve diferença no consumo alimentar total dos grupos ($F_{2,21} = 0,7525$; $p = 0,4834$; Figura 20C').

Figura 20 - Ganho de Peso e Consumo alimentar das progenitoras ao longo do período experimental

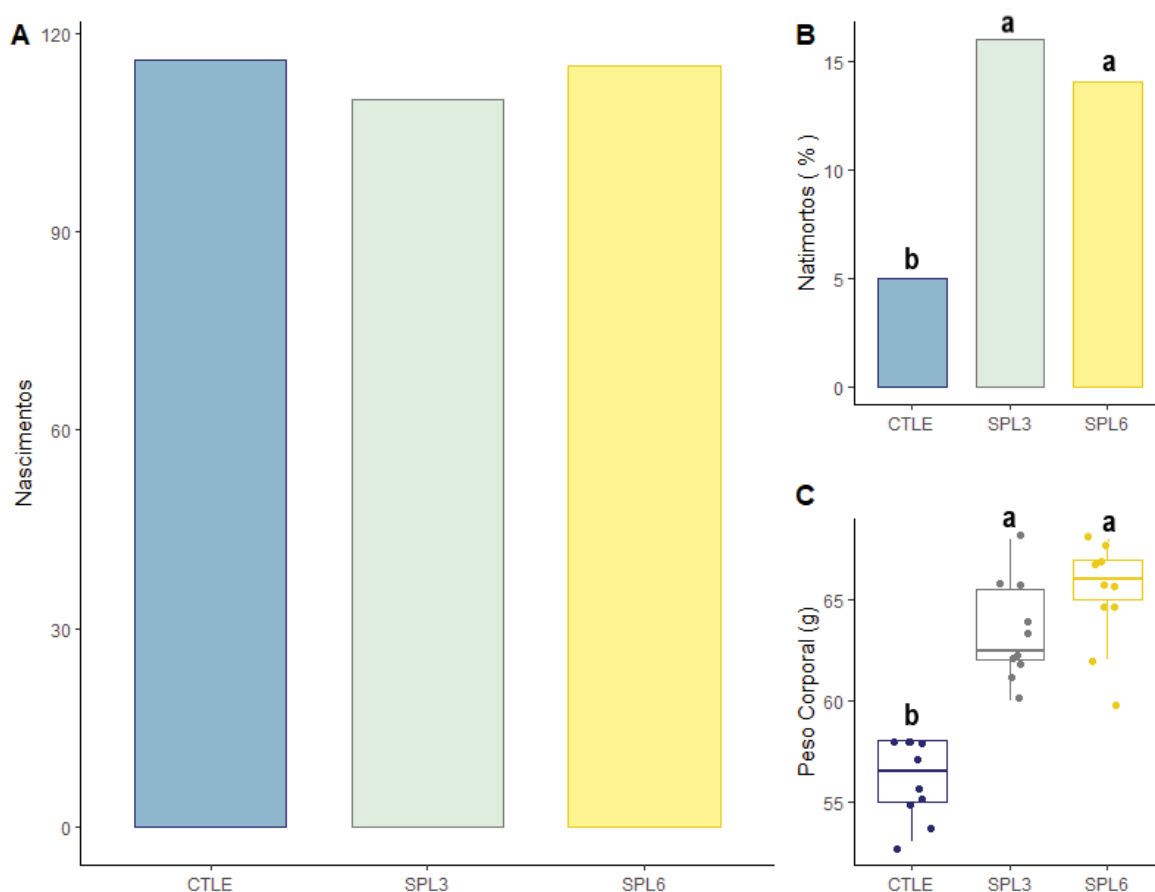


Legenda: A: Lineplot da curva de Ganho de Peso Percentual de ratas *Wistar* durante todo o período experimental. B: Boxplot do Ganho de Peso Percentual das progenitoras durante todo o período experimental. C: Boxplot da Área sob a Curva (AUC) do Ganho de Peso total das progenitoras ao longo do tempo. A': Lineplot da curva de Consumo Alimentar das progenitoras durante todo o período experimental. B': Boxplot do Consumo Alimentar das progenitoras durante todo o período experimental. C': Boxplot da Área sob a Curva (AUC) do Consumo Alimentar das progenitoras ao longo do tempo. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Observações semanais durante 11 semanas. Significância adotada de 95%.

4.1.1 Nascimentos

No dia do nascimento da prole, os animais foram manipulados para a contagem, sexagem e quantificação de natimortos. O número de filhotes vivos e mortos (Figura. 21A e B) foi analisado pelo Teste Qui-Quadrado de Aderência, não sendo observada uma interferência da suplementação com ômega 3 e 6 sobre o número total de nascimentos ($\chi^2 = 0,1818$; $df = 2$; $p = 0,9131$), porém com relação ao efeito da suplementação sobre o número de natimortos ($\chi^2 = 6,2$; $df = 2$; $p = 0,0451$), identificou-se que ambas as suplementações provocaram um aumento de 220% na mortalidade de filhotes quando comparadas com as proles controle. Após a padronização das ninhadas, sendo fixado o número de 8 filhotes por ninhada (4 fêmeas e 4 machos), todas as proles foram pesadas (Figura 21C), tendo sido observado um maior peso das ninhadas suplementadas (SLP3 e SLP6) quando comparadas ao controle ($F_{2,27} = 42,0321$; $p < 0,0001$; $CV = 3,83\%$).

Figura 21 - Dados do dia do nascimento da prole de ratas *Wistar*.

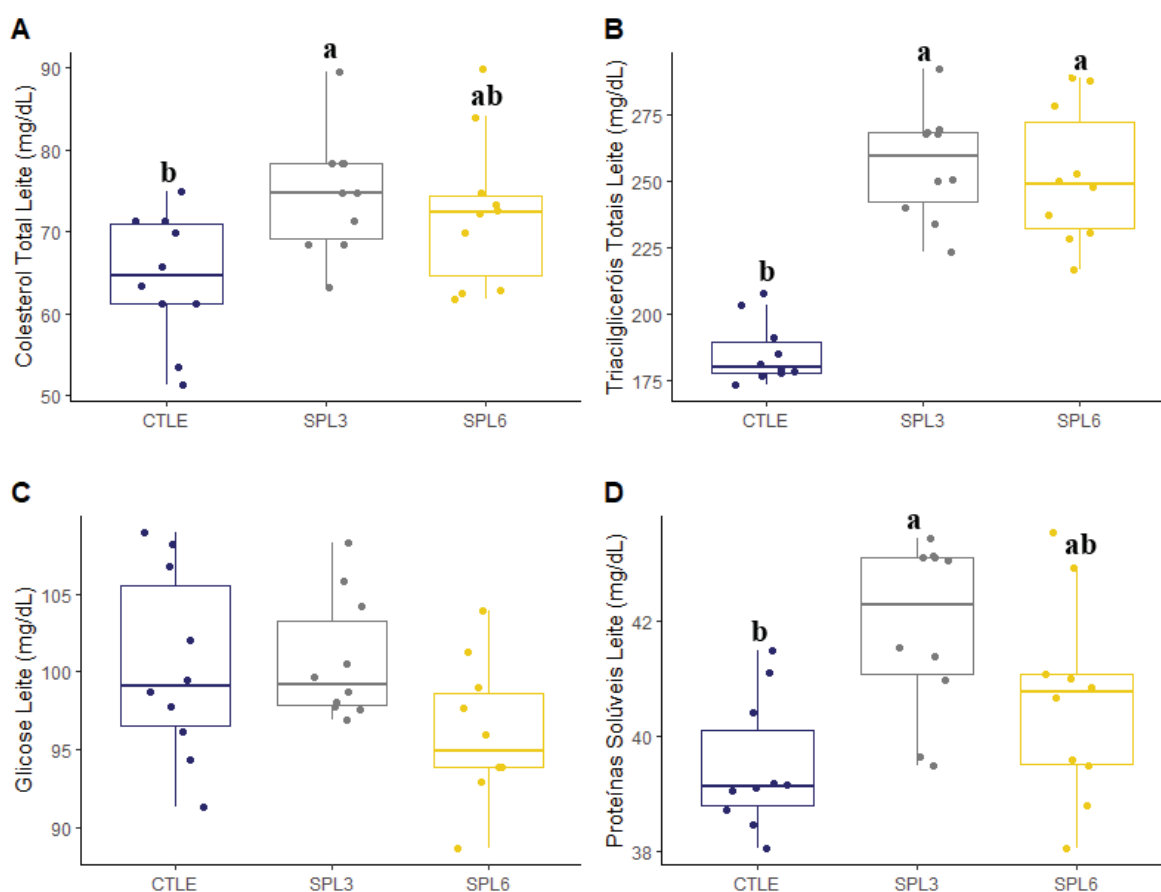


Legenda: A: Barplot da quantidade de nascimentos por grupo. B: Barplot da quantidade de natimortos por grupo. C: Boxplot do peso das ninhadas padronizadas (g). CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.1.2 Análise Bioquímica do Leite e Plasma das Ratas

A análise do perfil bioquímico do leite permitiu identificar que as concentrações de Colesterol Total e as Proteínas Solúveis (Figura 22A e D), no leite das ratas SLP3 são maiores que as CTLE, enquanto que o leite de SPL6 possui valores intermediários para estes parâmetros ($F_{2,27} = 4,3352$; $p = 0,0233$; $CV = 11,54\%$; $F_{2,27} = 6,7257$; $p = 0,0046$; $CV = 3,63\%$, respectivamente). Tratando-se dos Triacilgliceróis Totais (Figura 22B), observou-se que as ratas suplementadas, independentemente do tipo de óleo empregado, possuem as médias superiores as CTLE ($F_{2,27} = 39,0281$; $p < 0,0001$; $CV = 8,68\%$). Os valores encontrados para Glicose Total (Figura 22C) não foram diferentes entre os grupos ($F_{2,27} = 2,8016$; $p = 0,0784$; $CV = 4,92\%$).

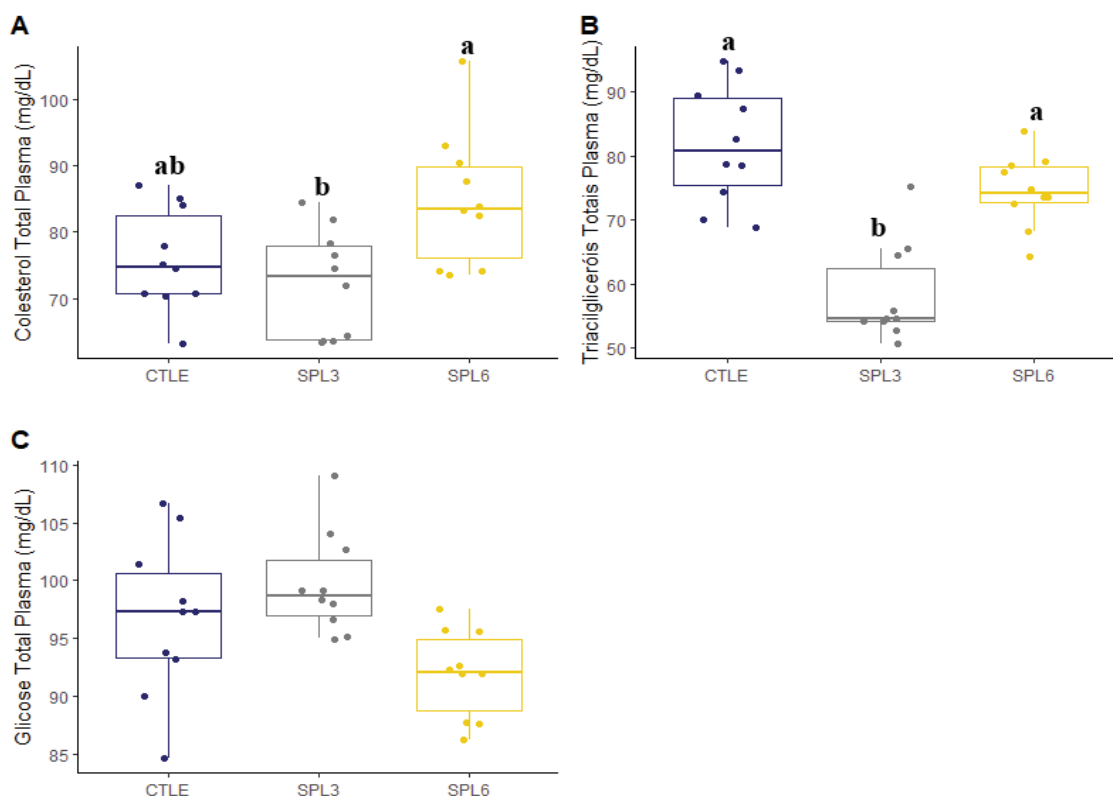
Figura 22 - Perfil Bioquímico do Leite Materno



Legenda: Boxplots de A: Colesterol Total (mg/dL); B: Triacilgliceróis Totais (mg/dL); C: Glicose Total (mg/dL); e D: Proteínas Solúveis (mg/dL) do leite de ratas *Wistar*. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

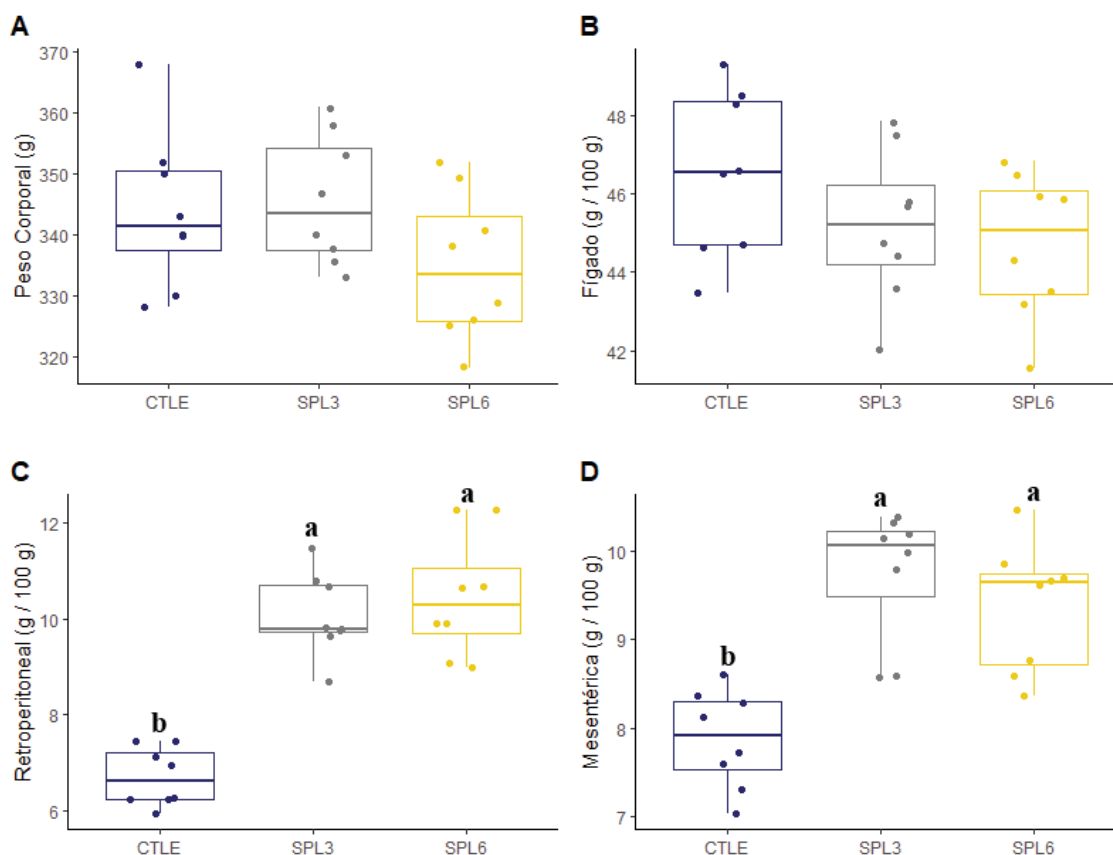
Ao comparar as concentrações de Colesterol Total entre os grupos (Figura 23A), observou-se que as concentrações são maiores no plasma de ratas SPL6 que as de ratas CTLE e SPL3 ($F_{2,27} = 7,3487$; $p = 0,0028$; $CV = 12,06\%$). Com relação às concentrações de Triacilgliceróis Totais (Figura 23B) observou-se valores menores nas SPL3 quando comparadas às CTLE e SPL6 ($F_{2,27} = 13,5051$; $p < 0,0001$; $CV = 12,91\%$). Da mesma forma que no leite, não houve diferença nas concentrações de Glicose Total (Figura 23C) entre os grupos ($F_{2,27} = 3,1273$; $p = 0,0601$; $CV = 6,94\%$).

Figura 23 - Perfil Bioquímico Plasmático Materno



Legenda: Boxplots de A: Colesterol Total (mg/dL); B: Triacilgliceróis Totais (mg/dL); C: Glicose Total (mg/dL) do plasma de ratas *Wistar*. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

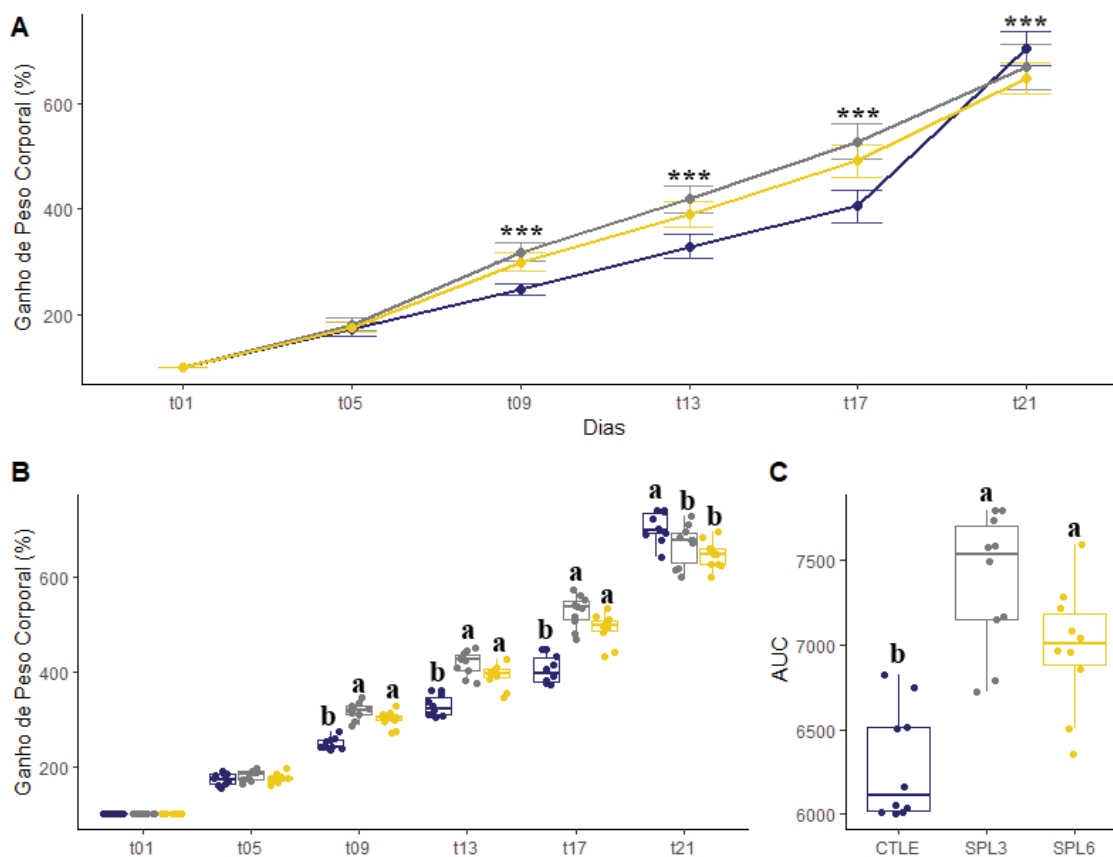
Ao comparar o Peso Corporal e o Peso do Fígado (Figura 24A e B) não houve diferença entre os grupos ($F_{2,23} = 1,9498$; $p = 0,1672$; $CV = 3,49\%$; $F_{2,23} = 1,7754$, $p = 0,1939$; $CV = 4,33\%$, respectivamente). Contudo, os depósitos de Tecido Adiposo, tanto o Retroperitoneal (Figura 24C), quanto o Mesentérico (Figura 24D) foram significativamente maiores nas fêmeas SPL3 e SPL6 quando comparadas às CTLE ($F_{2,23} = 37,73$; $p < 0,0001$; $CV = 10,46\%$; $F_{2,23} = 10,7606$; $p = 0,0006$; $CV = 9,19\%$, respectivamente).

Figura 24 – Variáveis Corporais das Progenitoras

Legenda: Boxplots de A: Peso Corporal (g); B: Fígado (g/100g); C: Tecido Adiposo Retroperitoneal (g/100g); e D: Tecido Adiposo Mesentérico de ratas *Wistar*. CTL: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

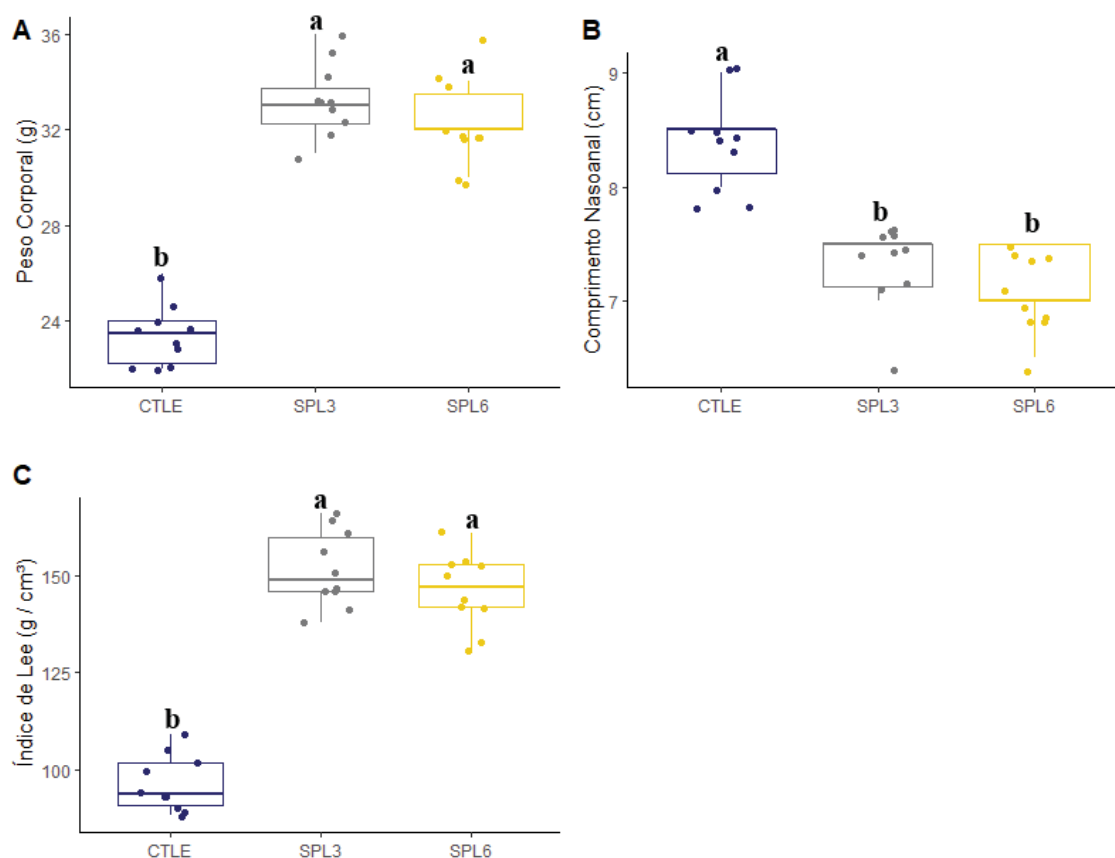
4.2. PROLE

Após o nascimento, as proles tiveram o peso corporal (Figura 25) acompanhado durante os 21 dias de lactação. Ao analisar o ganho percentual de peso corporal entre os grupos, notou-se diferença a partir do nono dia de vida dos animais ($F_{2,10} = 15,0391$; $p < 0,0001$; Figura 25A), as proles SPL3 e SPL6 mantiveram o maior peso percentual até o 17º dia de vida quando comparadas ao CTLE. Contudo, ao desmame no 21º dia de vida, as proles CTLE apresentavam maior peso percentual que as SPL6, enquanto as SPL3 tiveram valores intermediários entre os dois grupos (Figura 25B). Tratando-se do ganho de peso ao longo do período de lactação (Figura 25C), é possível notar que as proles SPL3 e SPL6 possuem maior ganho de peso que as CTLE ($F_{5,10} = 40,0311$; $p < 0,0001$).

Figura 25 - Evolução do Peso Corporal das Ninhadas até o desmame

Legenda: A: Lineplot da curva de Ganho de Peso Percentual das proles de ratas *Wistar* durante a lactação, *** $p < 0,001$ comparados às CTL; B: Boxplot do Ganho de Peso Percentual das proles durante a lactação, letras diferentes representam diferença estatística dentro dos tempos avaliados. C: Boxplot da Área sob a Curva (AUC) do Ganho de Peso total dos grupos ao longo do tempo, letras diferentes representam diferença entre os grupos. CTL: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Duas observações semanais durante 12 semanas, NASC: dia de nascimento das proles, DESM: dia do desmame das proles. Significância adotada de 95%.

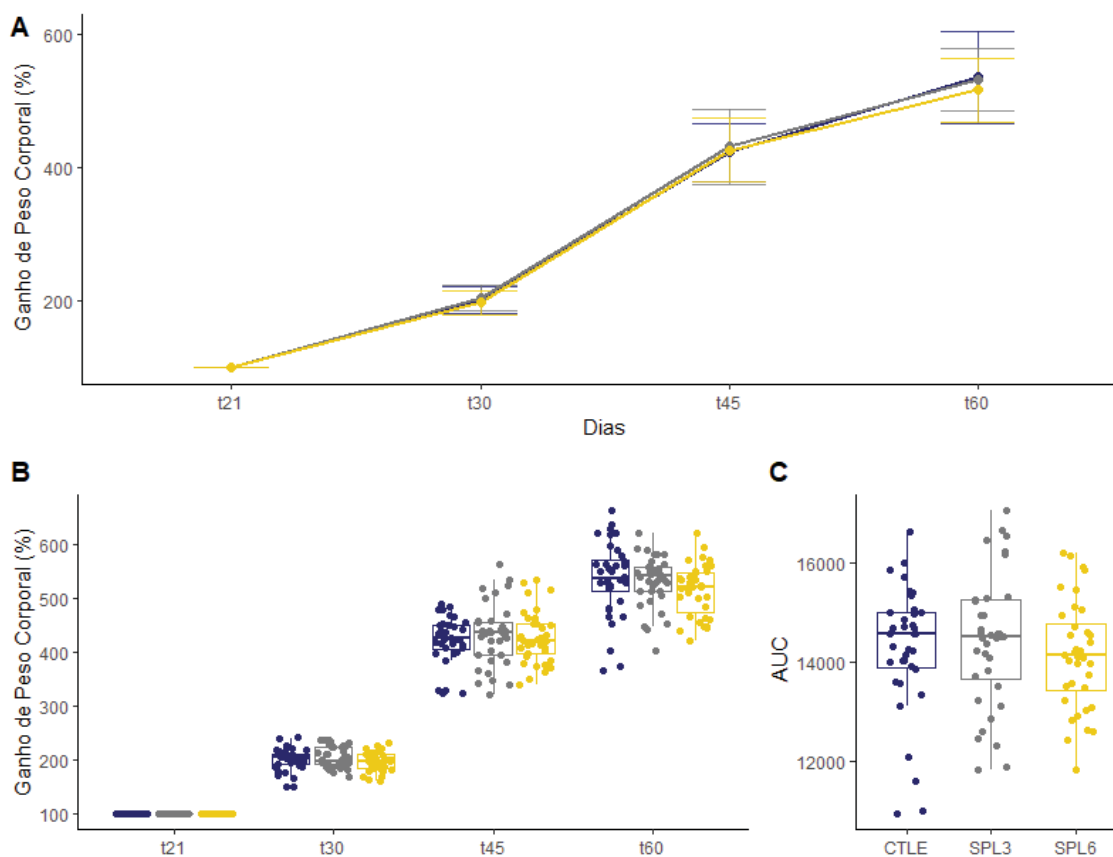
Aos 14 dias de vida, as ninhadas foram novamente pesadas, tiveram o comprimento nasoanal (CNA) mensurado e o índice de Lee (LEE) calculado. Analisando o PC (Figura 26A) e LEE (Figura 26C), observou-se que as proles suplementadas apresentavam médias maiores do que as proles CTLE ($F_{2,27} = 117,71$; $p < 0,0001$; $CV = 5,28\%$; $F_{2,27} = 116,67$; $p < 0,0001$; $CV = 6,8\%$, respectivamente), entretanto a avaliação do CNA (Figura 26B), evidenciou que as proles suplementadas apresentaram menor tamanho que as CTLE ($F_{2,27} = 40,7691$; $p < 0,0001$; $CV = 4,61\%$).

Figura 26 - Características Corporais aos 14 dias

Legenda: Boxplots dos intervalos de confiança do A: PC (g); B: CNA (cm); C: LEE (g/cm³) da prole de ratas *Wistar* aos 14 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.2.1 Desmames

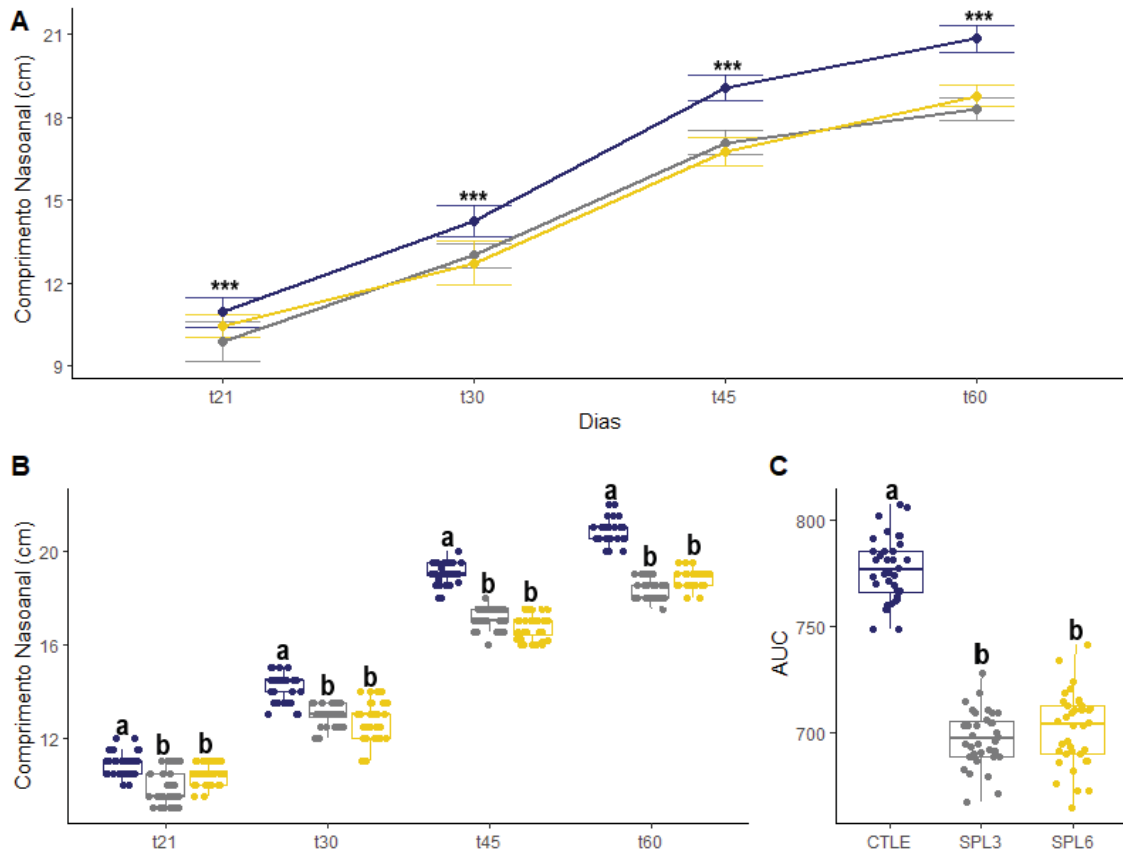
Alcançada a idade de 21 dias de vida foi realizado o desmame dos animais. Estes foram separados e o PC (Figura 27) e o CNA (Figura 28) foram mensurados aos 21, 30, 45 e 60 dias de vida. Tratando-se do peso corporal, não foi observada diferença entre os grupos ao longo do período experimental ($F_{2,6} = 1,1636$; $p = 0,3256$; Figura 27A), uma vez que o ganho de peso foi igual ao longo de todo o período ($F_{2,3} = 44451,3607$; $p < 0,0001$; Figura 27B e C).

Figura 27 - Evolução do Peso Corporal após o desmame

Legenda: A: Lineplot da curva de Peso Corporal Percentual (g) das proles de ratas *Wistar* após o desmame. B: Boxplot do PC Percentual das proles após o desmame. C: Boxplot da AUC do PC total dos grupos ao longo do tempo. * $p < 0,05$ comparadas ao CTLE. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Significância adotada de 95%.

Tratando-se do CNA, foi observada diferença entre os grupos ao longo do período experimental ($F_{2,6} = 30,6041$; $p < 0,0001$; Figura 28A). Ao avaliar o CNA total ao longo do período, foi possível notar que as proles SPL3 e SPL6 apresentaram menor comprimento do que as CTLE ($F_{3,6} = 6646,639$; $p < 0,0001$; Figura 28B e C).

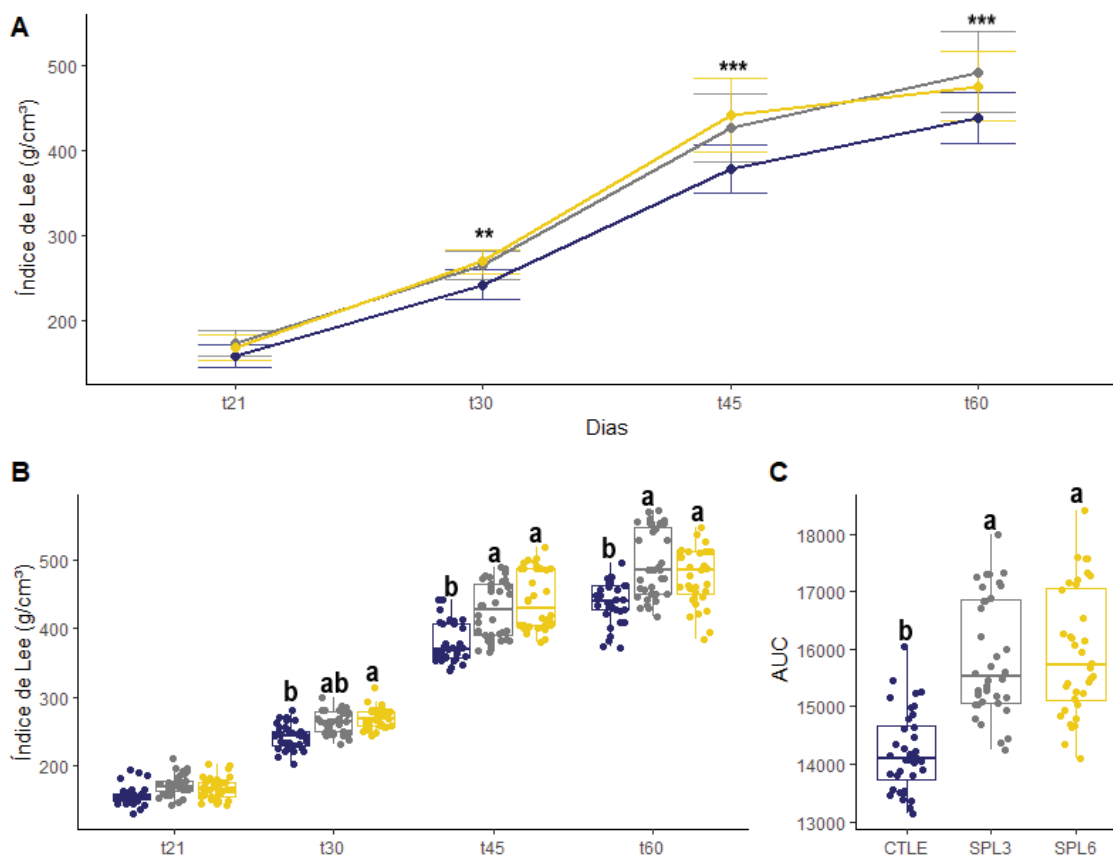
Figura 28 - Evolução do Comprimento Nasoanal após o desmame



Legenda: A: Lineplot da curva de CNA (cm) das proles de ratas *Wistar* após o desmame, *** p < 0,001 comparados ao CTLE. B: Boxplot do CNA das proles após o desmame, letras diferentes representam diferença entre os grupos dentro dos tempos. C: Boxplot da AUC do CNA total dos grupos ao longo do tempo, letras diferentes representam diferenças entre os grupos. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Significância adotada de 95%.

Ao avaliar o LEE, foi observada diferença entre os grupos ao longo do período experimental ($F_{2,6} = 10,151$; $p < 0,0001$; Figura 29A). Ao avaliar o LEE total ao longo do período, foi possível notar que as proles SPL3 e SPL6 apresentaram maior índice de LEE do que as CTLE, a partir dos 30 dias de vida ($F_{3,6} = 3468,746$; $p < 0,0001$; Figura 29B e C).

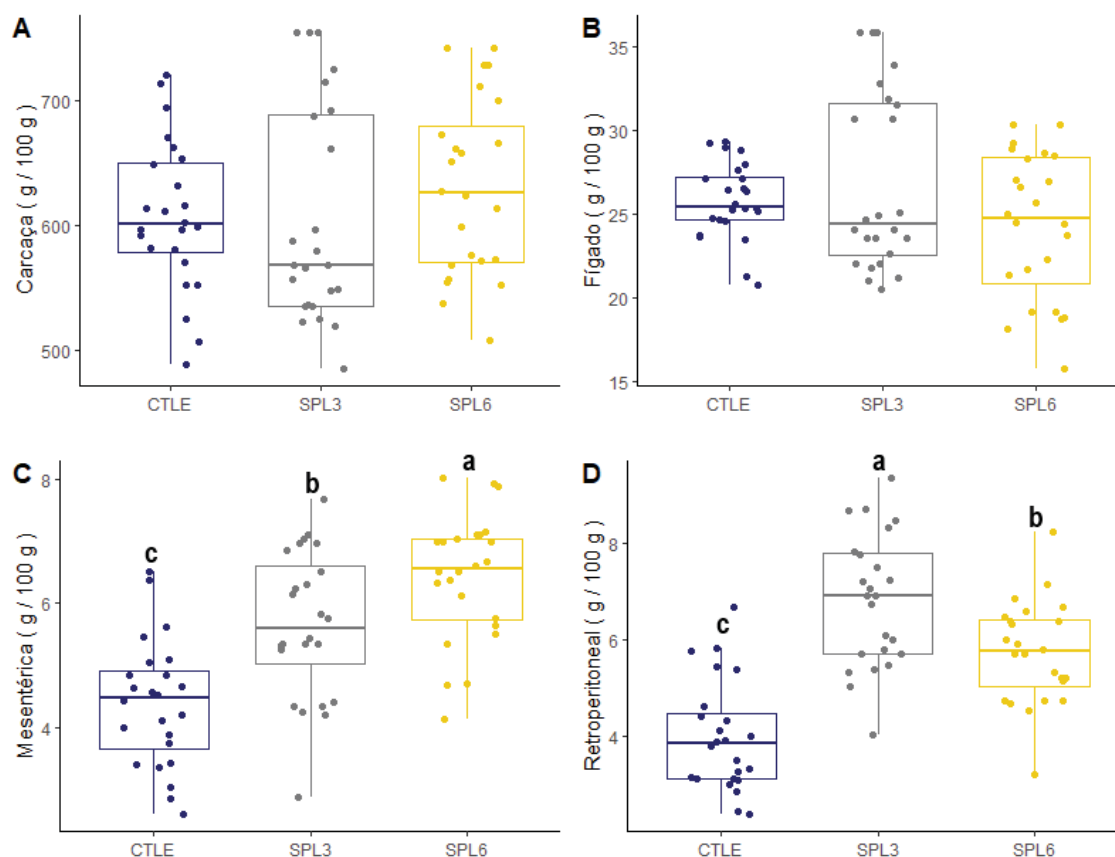
Figura 29 - Evolução do Índice de Lee após o desmame



Legenda: A: Lineplot da curva do LEE (g/cm³) das proles de ratas *Wistar* após o desmame, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao CTLE. B: Boxplot do LEE das proles após o desmame, letras diferentes representam diferença entre os grupos dentro dos tempos. C: Boxplot da AUC do LEE total dos grupos ao longo do tempo, letras diferentes representam diferenças entre os grupos. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Significância adotada de 95%.

3.2.2 Variáveis Corporais na Eutanásia

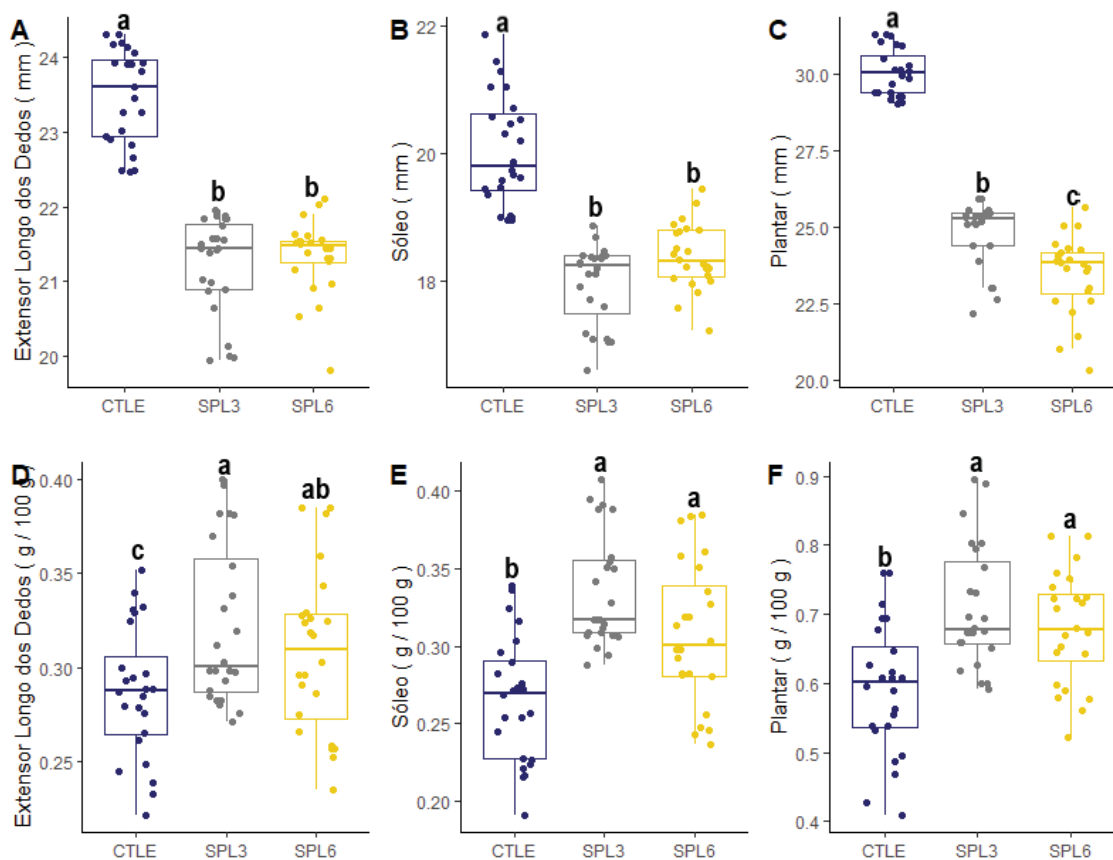
Ao avaliar o peso padronizado dos tecidos, pode-se observar que o peso da carcaça ($F_{2,69} = 0,83694$; $p = 0,4378$; CV = 12%; Figura 30A) e do fígado ($F_{2,69} = 2,184$; $p = 0,1203$; CV = 16,36%; Figura 30B) não foi diferente entre os grupos. Contudo, ao comparar o peso do tecido adiposo mesentérico ($F_{2,69} = 21,852$; $p < 0,0001$; CV = 19,67%; Figura 30C) verificou-se que as proles SPL6 apresentaram maiores médias quando comparadas aos valores de CTLE e SPL3. As médias do grupo SPL3 por sua vez também apresentaram médias superiores que as CTLE. Tratando-se do tecido adiposo retroperitoneal ($F_{2,69} = 34,058$; $p < 0,0001$; CV = 21,83%; Figura 30D) houve aumento do peso no tecido, mas com as proles SPL3 apresentando médias superiores as SPL6 e CTLE, e SPL6 apresentando maiores médias que as de CTLE.

Figura 30 - Peso Visceral Padronizado

Legenda: Boxplots do peso padronizado (g/100g) de A: Carcaca; B: Fígado; C: Tecido Adiposo Mesentérico; D: Tecido Adiposo Retroperitoneal da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar o comprimento dos músculos extensor longo dos dedos ($F_{2,69} = 108,74$; $p < 0,0001$; CV = 2,71%; Figura 31A), sóleo ($F_{2,69} = 61,87$; $p < 0,0001$; CV = 3,68%; Figura 31B) e plantar ($F_{2,69} = 258,71$; $p < 0,0001$; CV = 4,06%; Figura 31C) foi possível notar que as proles SPL3 e SPL6 apresentaram menores comprimentos musculares que as CTLE, sendo que as proles SPL6 apresentaram também menores tamanhos no músculo plantar quando comparados à SPL3. Tratando-se do peso do músculo extensor longo dos dedos ($F_{2,69} = 4,4508$; $p = 0,0152$; CV = 13,22%; Figura 31D) os maiores valores foram identificados nas proles SPL3, enquanto as proles SPL6 apresentaram pesos intermediários e similares aos outros dois grupos, quando comparados ao CLTE. Contudo, o peso dos músculos sóleo ($F_{2,69} = 17,479$; $p < 0,0001$; CV = 13,55%; Figura 31E) e plantar ($F_{2,69} = 11,414$; $p < 0,0001$; CV = 13,44%; Figura 31F) das proles SPL3 e SPL6 apresentaram maiores médias de peso que as do CTLE.

Figura 31 - Variáveis Macroscópicas Musculares

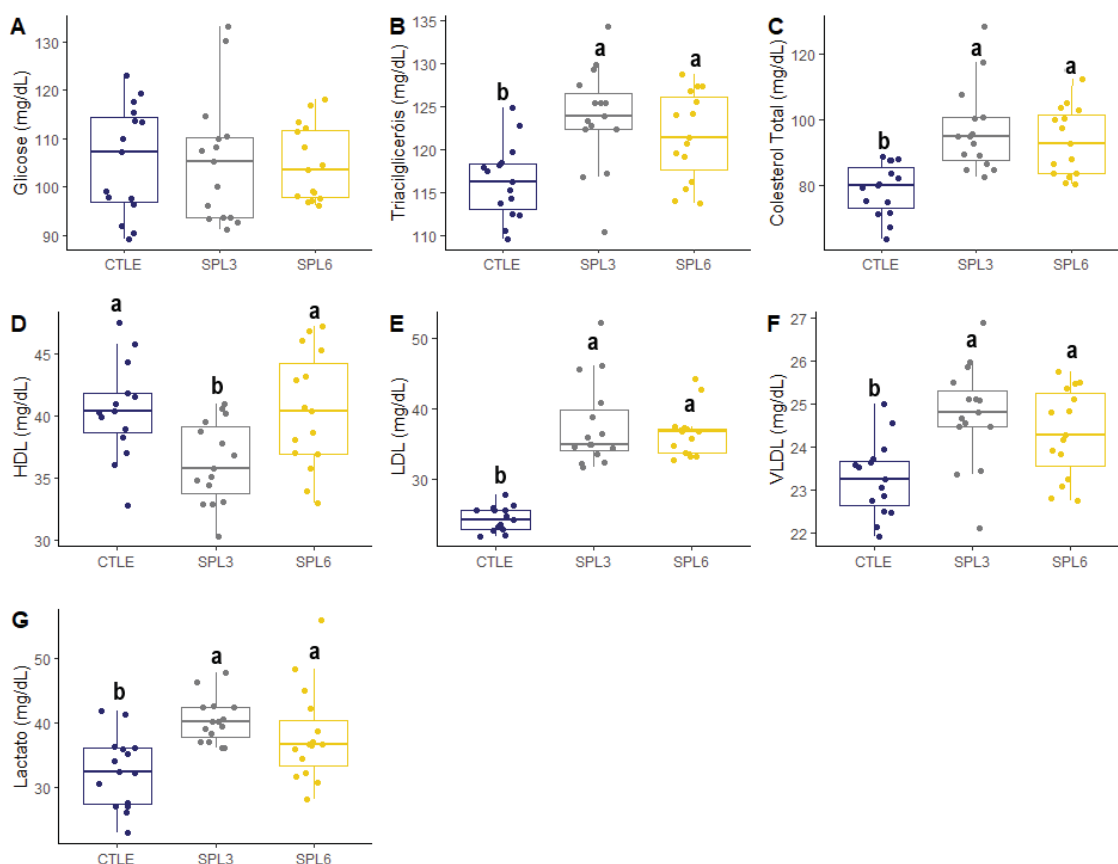


Legenda: Boxplots do comprimento (cm) e peso padronizado (g/100g) dos músculos A e C: Extensor Longo dos Dedos; B e E: Sóleo; C e F: Plantar da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

4.2.3 Perfil Bioquímico Plasmático

Ao avaliar as variáveis relacionadas à mobilização lipídica, observou-se aumento da concentração dos triacilgliceróis ($F_{2,42} = 8,4712$; $p < 0,0001$; $CV = 4,26\%$; Figura 32B), colesterol total ($F_{2,42} = 12,091$; $p < 0,0001$; $CV = 11,78\%$; Figura 32C), colesterol LDL ($F_{2,42} = 48,587$; $p < 0,0001$; $CV = 12,48\%$; Figura 32E) e colesterol VLDL ($F_{2,42} = 8,4712$; $p < 0,0001$; $CV = 4,26\%$; Figura 32F) nas proles SPL3 e SPL6 quando comparadas às CTLE. Contudo, identificou-se redução da concentração do colesterol HDL ($F_{2,42} = 5,6361$; $p = 0,0067$; $CV = 10,06\%$; Figura 32D) foi possível observar diminuição deste nas proles SPL3 quando comparadas com as demais. Tratando-se do marcador de estresse muscular lactato ($F_{2,42} = 7,828$; $p = 0,0012$; $CV = 15,23\%$; Figura 32G) foi possível observar aumento da concentração nas proles SPL3 e SPL6 quando comparadas às CTLE. Quanto a avaliação da glicemia não houve diferença entre os grupos ($F_{2,42} = 7,828$; $p = 0,9387$; $CV = 10,52\%$; Figura 32A)

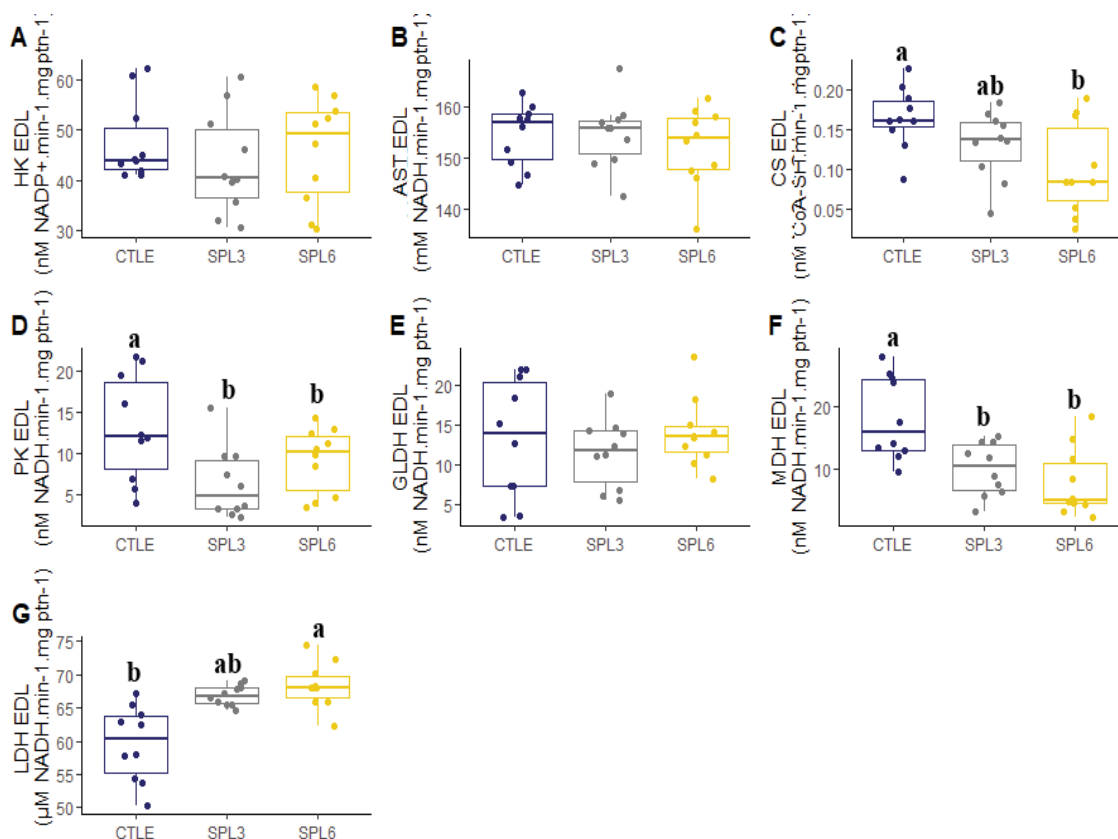
Figura 32 - Perfil Bioquímico Plasmático



Legenda: Boxplots de A: Glicose; B: Triacilgliceróis Totais; C: Colesterol Total; D: Colesterol HDL; E: Colesterol LDL; F: Colesterol VLDL; G: Lactato da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

4.2.4 Metabolismo Energético

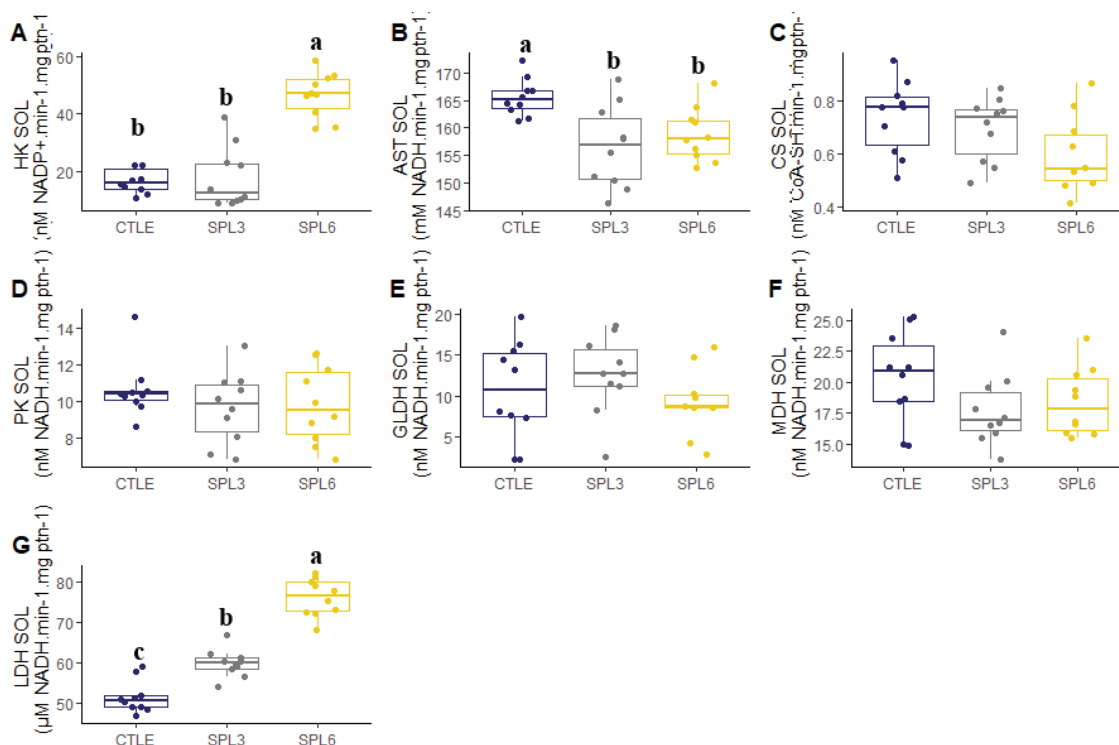
Ao avaliar as enzimas do metabolismo energético do músculo extensor longo dos dedos, não foi observada diferença entre os grupos na atividade da HK ($F_{2,27} = 0,2671$; $p = 0,7676$; CV = 20,54%; Figura 33A), da AST ($F_{2,27} = 0,7572$; $p = 0,4787$; CV = 4,37%; Figura 33B) e da GLDH ($F_{2,27} = 0,5241$; $p = 0,5979$; CV = 42,97%; Figura 33E). A avaliação da atividade da LDH ($F_{2,27} = 10,639$; $p < 0,0001$; CV = 3,4%; Figura 33G) e da CS ($F_{2,27} = 4,6872$; $p = 0,0178$; CV = 36,08%; Figura 33C) foi possível identificar aumento nas médias das proles SPL6 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL3 apresentaram valores intermediários e similares aos outros dois grupos. Quando analisada a atividade da PK ($F_{2,27} = 4,2425$; $p = 0,02499$; CV = 51,73%; Figura 33D) observou-se elevação da atividade nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários. Já a MDH ($F_{2,27} = 9,7085$; $p < 0,0001$; CV = 46,16%; Figura 33F) apresentou atividade reduzida nas proles SPL3 e SPL6, quando comparadas às CTLE.

Figura 33 - Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos

Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do metabolismo energético do músculo extensor longo dos dedos. A: Hexoquinase ($\mu\text{M NADP}^+$ reduzido $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); B: Aspartato Aminotransferase ($\text{mM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); C: Citrato Sintase ($\text{nM CoA-SH produzido} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); D: Piruvato Quinase ($\mu\text{M NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); E: Glutamato Desidrogenase ($\text{nM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); F: Malato Desidrogenase ($\text{nM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); G: Lactato Desidrogenase ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1}$) da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar as enzimas do metabolismo energético do músculo sóleo, não foi observada diferença entre os grupos na atividade da PK ($F_{2,27} = 0,7799$; $p = 0,4684$; $\text{CV} = 20,98\%$; Figura 34D), da CS ($F_{2,27} = 1,7149$; $p = 0,1991$; $\text{CV} = 25,08\%$; Figura 34C), da MDH ($F_{2,27} = 1,8443$; $p = 0,1775$; $\text{CV} = 16,68\%$; Figura 34F) e da GLDH ($F_{2,27} = 1,1538$; $p = 0,3305$; $\text{CV} = 46,32\%$; Figura 34E). Contudo, foi possível observar a diminuição da atividade da AST ($F_{2,27} = 19,2411$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 2,16\%$; Figura 34A) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Com relação à atividade de LDH ($F_{2,27} = 104,68$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 6,2\%$; Figura 34B) foi identificado aumento da atividade nas proles SPL6 quando comparadas ao CTLE e SPL3, tendo SPL3 quando comparadas às CTLE. Da mesma forma, houve aumento na atividade de HK ($F_{2,27} = 36,462$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 31,41\%$; Figura 34C) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE e SPL3.

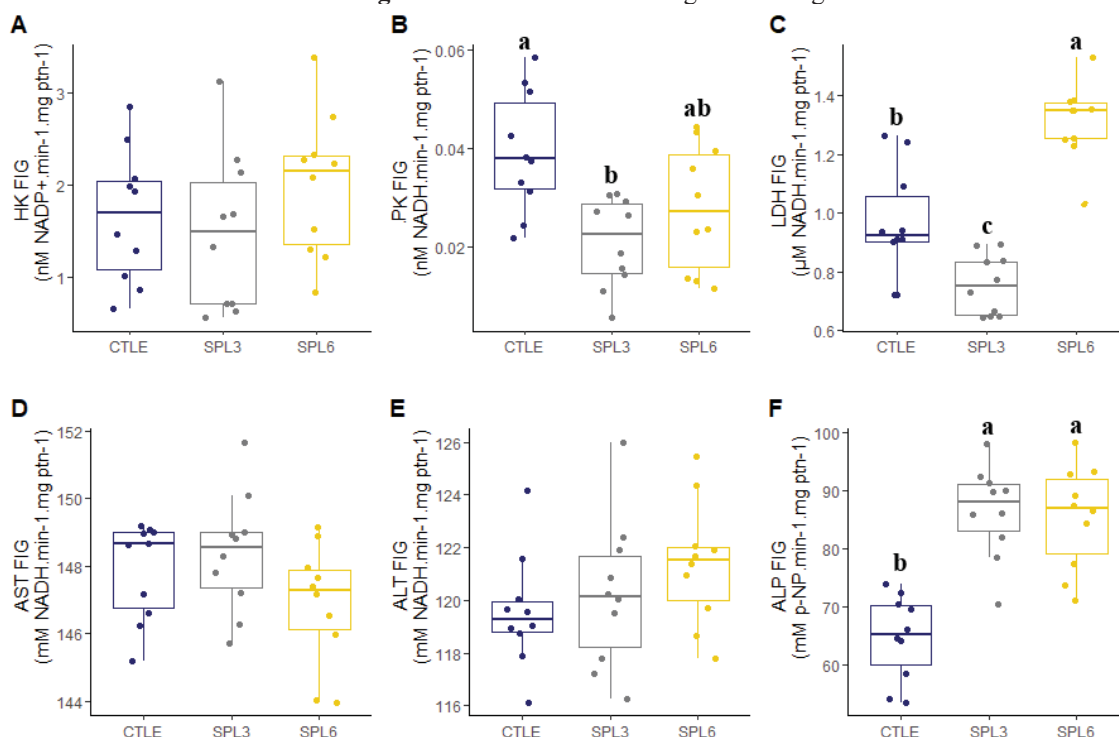
Figura 34 - Metabolismo Energético do Músculo Sóleo



Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do metabolismo energético do músculo sóleo. A: Hexoquinase ($\mu\text{M NADP}^+$ reduzido $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); B: Aspartato Aminotransferase ($\text{mM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); C: Citrato Sintase ($\text{nM CoA-SH produzido} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); D: Piruvato Quinase ($\mu\text{M NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); E: Glutamato Desidrogenase ($\text{nM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); F: Malato Desidrogenase ($\text{nM NADH oxidado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); G: Lactato Desidrogenase ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1}$) da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar as enzimas do metabolismo energético do fígado, não foi observada diferença entre os grupos na atividade da HK ($F_{2,27} = 1,0786$; $p = 0,3542$; $\text{CV} = 45,96\%$; Figura 35A), da AST ($F_{2,27} = 2,0991$; $p = 0,1421$; $\text{CV} = 1,13\%$; Figura 35D) e da ALT ($F_{2,27} = 1,3908$; $p = 0,2661$; $\text{CV} = 2,04\%$; Figura 35E). Contudo, foi possível observar a diminuição da atividade da PK ($F_{2,27} = 6,4715$; $p = 0,0051$; $\text{CV} = 39,21\%$; Figura 35B) nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários e semelhantes aos demais grupos. Enquanto isso, houve aumento da LDH ($F_{2,27} = 38,223$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 14,21\%$; Figura 35C) nas proles SPL6 quando comparadas ao CTLE, e diminuição nas SPL3 quando comparadas às CTLE. Da mesma forma, houve aumento na SLP ($F_{2,27} = 23,21$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 10,18\%$; Figura 35F) nas proles SPL quando comparadas às CTLE.

Figura 35 - Metabolismo Energético do Fígado



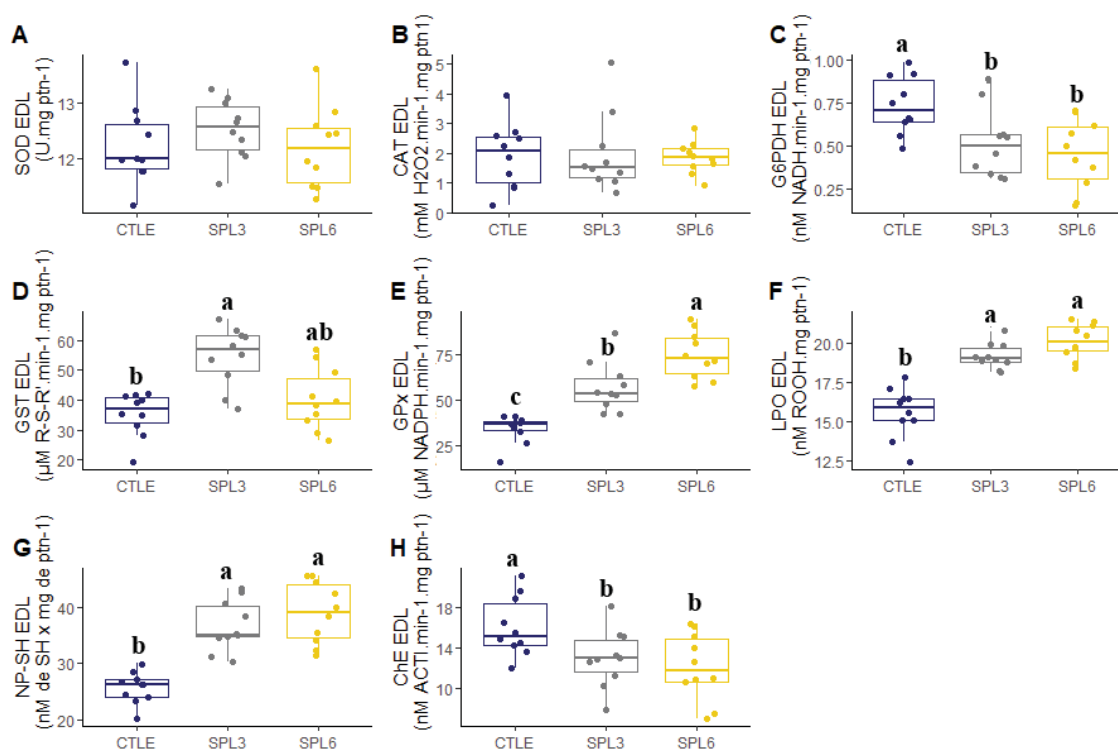
Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do metabolismo energético do músculo extensor longo dos dedos. A: Hexoquinase ($\mu\text{M NADP}^+$ reduzido $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); B: Piruvato Quinase ($\mu\text{M NADH}$ oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); C: Lactato Desidrogenase ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1}$); D: Aspartato Aminotransferase (mM NADH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); E: Alanina Aminotransferase (mM NADH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); F: Fosfatase Alcalina (mM p-Nitrofenol formado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$); da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.2.5 Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade

Ao avaliar as enzimas do sistema antioxidante do músculo extensor longo dos dedos, não foi observada diferença na atividade da SOD ($F_{2,27} = 0,7246$; $p = 0,4936$; $\text{CV} = 5,42\%$; Figura 36A) e da CAT ($F_{2,27} = 0,3711$; $p = 0,6934$; $\text{CV} = 43,10\%$; Figura 36B). Porém, houve aumento da GST ($F_{2,27} = 14,791$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 20,55\%$; Figura 36D) nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários e semelhantes aos demais grupos. No entanto, houve aumento da GPx ($F_{2,27} = 30,465$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 20,76\%$; Figura 36E) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE e SPL3, enquanto as proles SPL3 também foram diferentes das CTLE. Contudo, ocorreu redução da atividade da G6PDH ($F_{2,27} = 6,1119$; $p = 0,0064$; $\text{CV} = 33,94\%$; Figura 36H) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Foi possível identificar ainda, que as suplementações produziram aumento nas concentrações de da LPO ($F_{2,27} = 7,0708$; $p = 0,0033$; $\text{CV} = 16,98\%$; Figura 36F) e da concentração de NP-SH ($F_{2,27} = 25,941$; $p < 0,0001$; $\text{CV} = 12,97\%$; Figura 36G) quando comparadas às CTLE. Também, houve inibição da atividade da ChE ($F_{2,27} =$

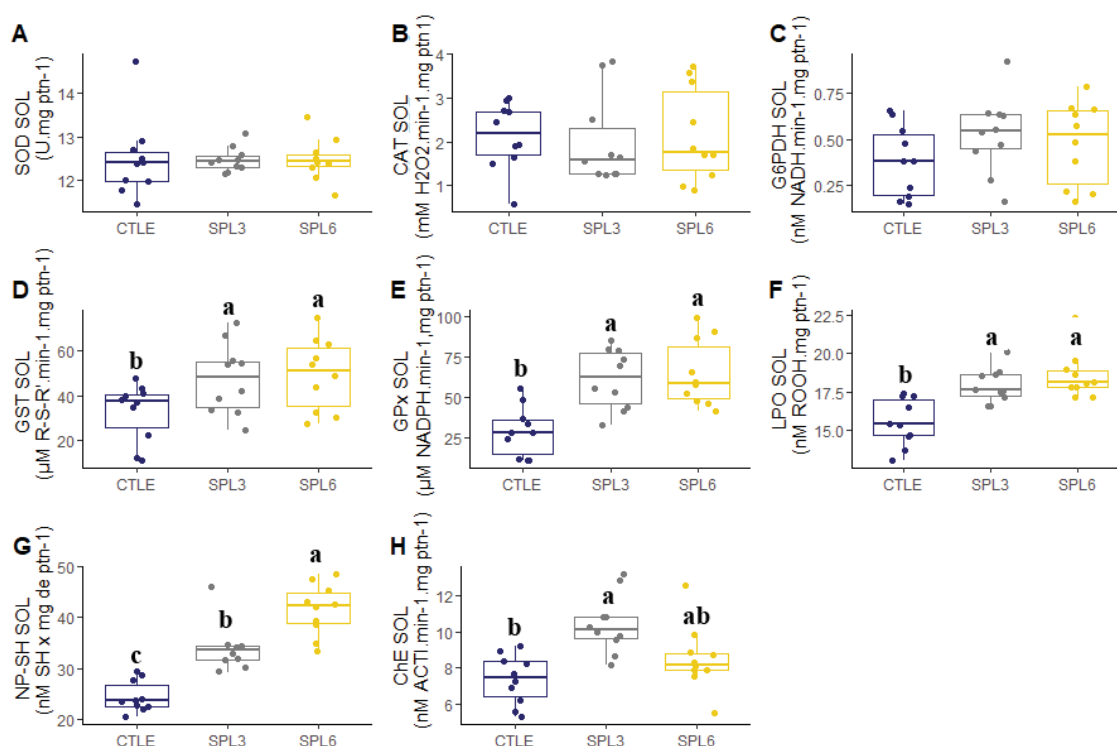
27,756; $p < 0,0001$; CV = 15,21%; Figura 36H), nas proles quando comparadas às CTLE.

Figura 36 - Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos



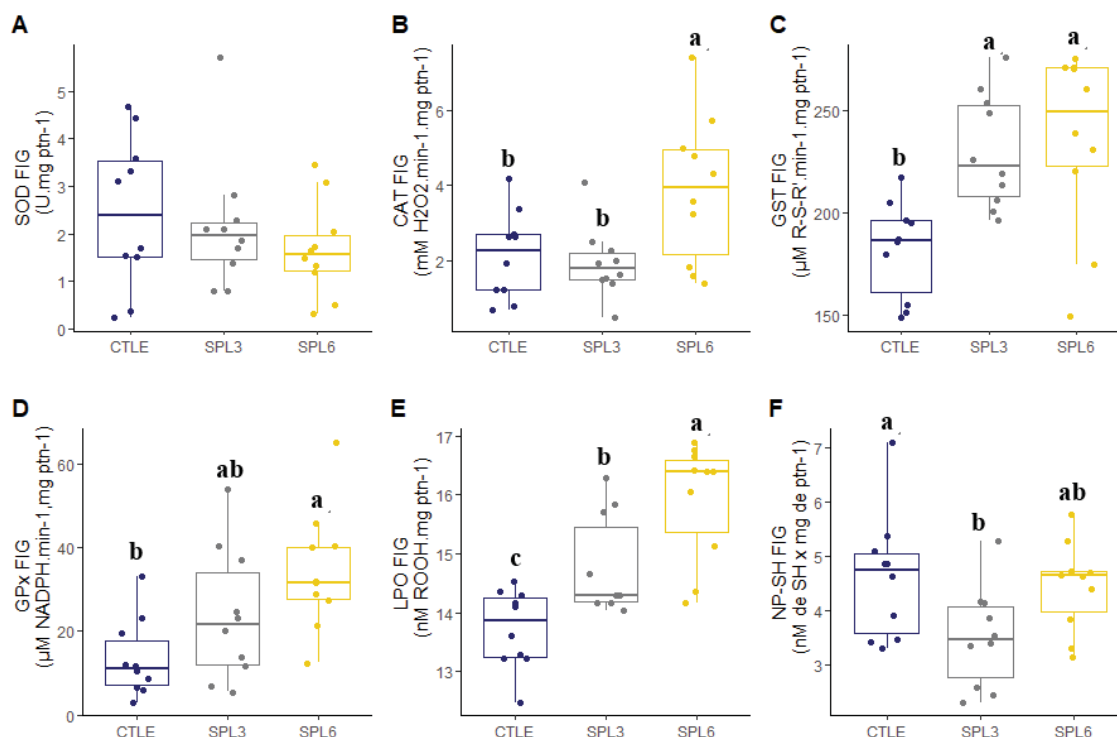
Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do sistema antioxidante, atividade neural e índice de dano oxidativo do músculo extensor longo dos dedos. A: Superóxido Dismutase (U x mg proteína⁻¹); B: Catalase (mM H₂O₂ consumido x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); C: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (nM NADH oxidado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); D: Glutathiona S-Transferase (μM Tioéter formado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); E: Glutathiona Peroxidase (μM NADPH oxidado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); F: Peroxidação de Lipídios (nM Hidroperóxidos x mg proteína⁻¹); G: Tióis não proteicos (nM Tióis x mg proteína⁻¹); H: Colinesterase Total (nM Acetilcolina hidrolizada x min⁻¹ x mg proteína⁻¹) da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar as enzimas do sistema antioxidante do músculo sóleo, não foi observada diferença na atividade da SOD ($F_{2,27} = 1,1949$; $p = 0,3182$; CV = 3,3%; Figura 37A), da CAT ($F_{2,27} = 0,0615$; $p = 0,9404$; CV = 45,97%; Figura 37B) e da G6PDH ($F_{2,27} = 1,2646$; $p = 0,2985$; CV = 45,81%; Figura 37C). Contudo, foi possível identificar que as suplementações produziram aumento na atividade da GST ($F_{2,27} = 13,271$; $p < 0,0001$; CV = 25,92%; Figura 37D), na GPx ($F_{2,27} = 11,529$; $p < 0,0001$; CV = 38,25%; Figura 37E), na enzima de atividade neural ChE ($F_{2,27} = 9,8862$; $p < 0,0001$; CV = 17,55%; Figura 37H) e no índice de LPO ($F_{2,27} = 26,498$; $p < 0,0001$; CV = 7,56%; Figura 37F) comparadas às CTLE. Já a concentração de NP-SH ($F_{2,27} = 36,048$; $p < 0,0001$; CV = 13,53%; Figura 37G) apresentou aumento nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, e ainda aumento nas SPL6 quando comparadas às SPL3.

Figura 37 - Sistema Antioxidante, Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo

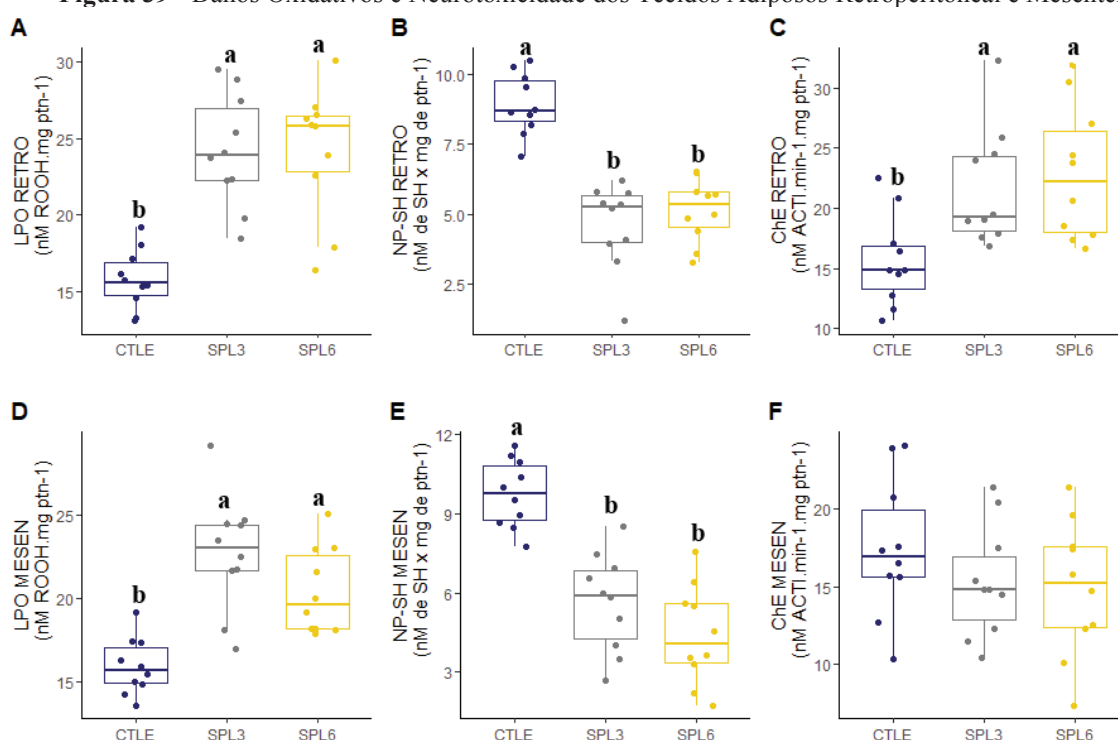
Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do sistema antioxidante, atividade neural e índice de dano oxidativo do músculo sóleo. A: Superóxido Dismutase (U x mg proteína⁻¹); B: Catalase (mM H₂O₂ consumido x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); C: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (nM NADH oxidado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); D: Glutathione S-Transferase (μM Tioéter formado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); E: Glutathione Peroxidase (μM NADPH oxidado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); F: Peroxidação de Lipídios (nM Hidroperóxidos x mg proteína⁻¹); G: Tióis não proteicos (nM Tióis x mg proteína⁻¹); H: Colinesterase Total (nM Acetilcolina hidrolizada x min⁻¹ x mg proteína⁻¹) da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar as enzimas do sistema antioxidante do fígado, não foi observada diferença na atividade da SOD ($F_{2,27} = 0,8205$; $p = 0,4508$; CV = 64,73%; Figura 38A). No entanto, houve aumento da CAT ($F_{2,27} = 5,7608$; $p = 0,0082$; CV = 53,98%; Figura 38B) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE e SPL3. Da mesma forma, houve aumento da GPx ($F_{2,27} = 6,0593$; $p = 0,0067$; CV = 56,43%; Figura 38D) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL3 apresentaram valores intermediários. Também, houve aumento da GST ($F_{2,27} = 8,1175$; $p = 0,0017$; CV = 15,21%; Figura 38C) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Tratando-se dos marcadores de estresse oxidativo, houve aumento na LPO ($F_{2,27} = 16,765$; $p < 0,0001$; CV = 5,72%; Figura 38E) nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, e também aumento das SPL6 quando comparadas às SPL3. De forma contrária, houve redução na concentração de NP-SH ($F_{2,27} = 3,7108$; $p = 0,0376$; CV = 23,14%; Figura 38F) nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as proles SPL6 apresentaram valores intermediários.

Figura 38 - Sistema Antioxidante e Danos Oxidativos do Fígado

Legenda: Boxplots da atividade de enzimas do sistema antioxidante e índice de dano oxidativo do fígado. A: Superóxido Dismutase (U x mg proteína⁻¹); B: Catalase (mM H₂O₂ consumido x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); C: Glutaciona S-Transferase (μM Tioéter formado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); D: Glutaciona Peroxidase (μM NADPH oxidado x min⁻¹ x mg proteína⁻¹); E: Peroxidação de Lipídios (nM Hidroperóxidos x mg proteína⁻¹); F: Tióis não proteicos (nM Tióis x mg proteína⁻¹ da prole de ratos *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar os marcadores de estresse oxidativo e neurotoxicidade dos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico foi possível observar aumento da LPO em ambos os tecidos ($F_{2,27} = 20,048$; $p < 0,0001$; CV = 15,94%; $F_{2,27} = 16,61$; $p < 0,0001$; CV = 13,54%; Figura 39A e D, respectivamente) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. De forma contrária, houve redução na concentração de NP-SH em ambos os tecidos ($F_{2,27} = 34,558$; $p < 0,0001$; CV = 20,4%; $F_{2,27} = 27,706$; $p < 0,0001$; CV = 25,45%; Figura 39B e E, respectivamente) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Já a atividade da ChE ($F_{2,27} = 6,4927$; $p = 0,0049$; CV = 24,03%; Figura 39C) apresentou aumento no tecido adiposo retroperitoneal das proles SPL quando comparadas às CTLE, enquanto não apresentou diferença no tecido adiposo mesentérico ($F_{2,27} = 1,1039$; $p = 0,34609$; CV = 26,19%; Figura 39F).

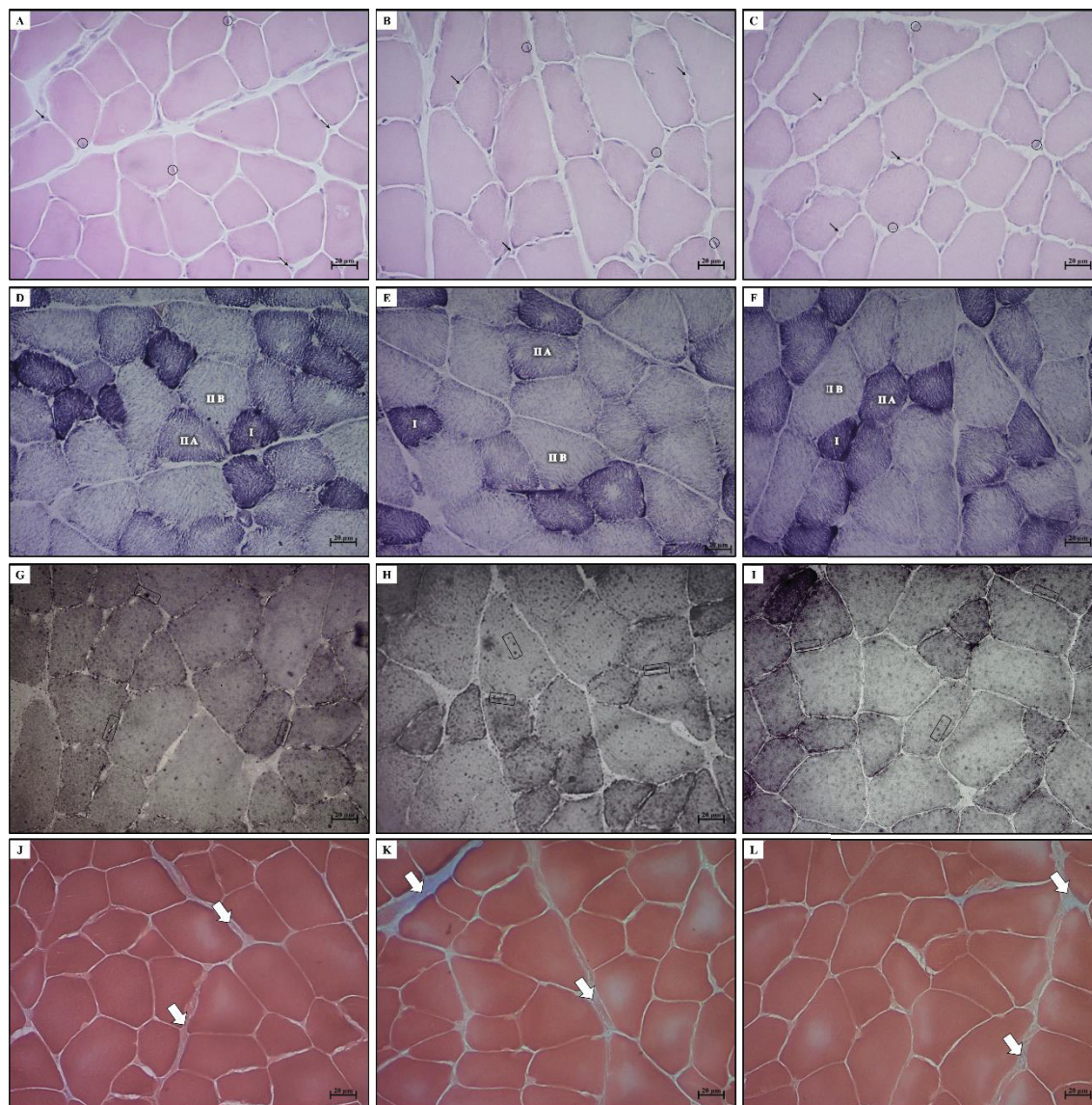
Figura 39 - Danos Oxidativos e Neurotoxicidade dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico

Legenda: Boxplots do índice de dano oxidativo e atividade neural do tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico. A e D: Peroxidação de Lipídios (nM Hidroperóxidos x mg proteína⁻¹); B e E: Tióis não proteicos (nM Tióis x mg proteína⁻¹); C e F: Colinesterase Total (nM Acetilcolina hidrolizada x min⁻¹ x mg proteína⁻¹) da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.2.6 Análises Histomorfométricas

O músculo plantar apresentou-se com estrutura padrão, caracterizado pela presença de fibras poligonais, alongadas e multinucleadas com núcleos deslocados centrifugamente do centro celular, imediatamente abaixo à membrana sarcoplasmática. As fibras musculares envoltas individualmente pelo tecido conjuntivo do endomísio, organizadas em fascículos musculares delimitados pelo perimísio. Associados aos envoltórios conjuntivos, ocorrem os capilares sanguíneos, nervos e fuso neuromusculares, responsáveis pela irrigação, inervação e controle neural das fibras. O músculo plantar é considerado um músculo misto, por apresentar quantidades consideráveis de fibras oxidativas (tipo I), fibras intermediárias (IIA) e fibras glicolíticas (IIB). Os lipídios são armazenados em forma de gotículas junto aos sarcômeros e as cadeias de mitocôndrias. Quando comparados ao CTLE (Figura 40A, D, G, J), os animais SPL apresentaram fibras com maiores tamanhos (Figura 40B e C), aumento do número de núcleos e capilares (Figura 40B e C), redução do número e tamanho de fibras oxidativas (Figura 40E e F), aumento do número e tamanho de fibras intermediárias e glicolíticas (Figura 40E e F), aumento da deposição lipídica (Figura 40H e I) e de tecido conjuntivo (Figura 40K e L).

Figura 40 - Fotomicrografia do Músculo Plantar da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida

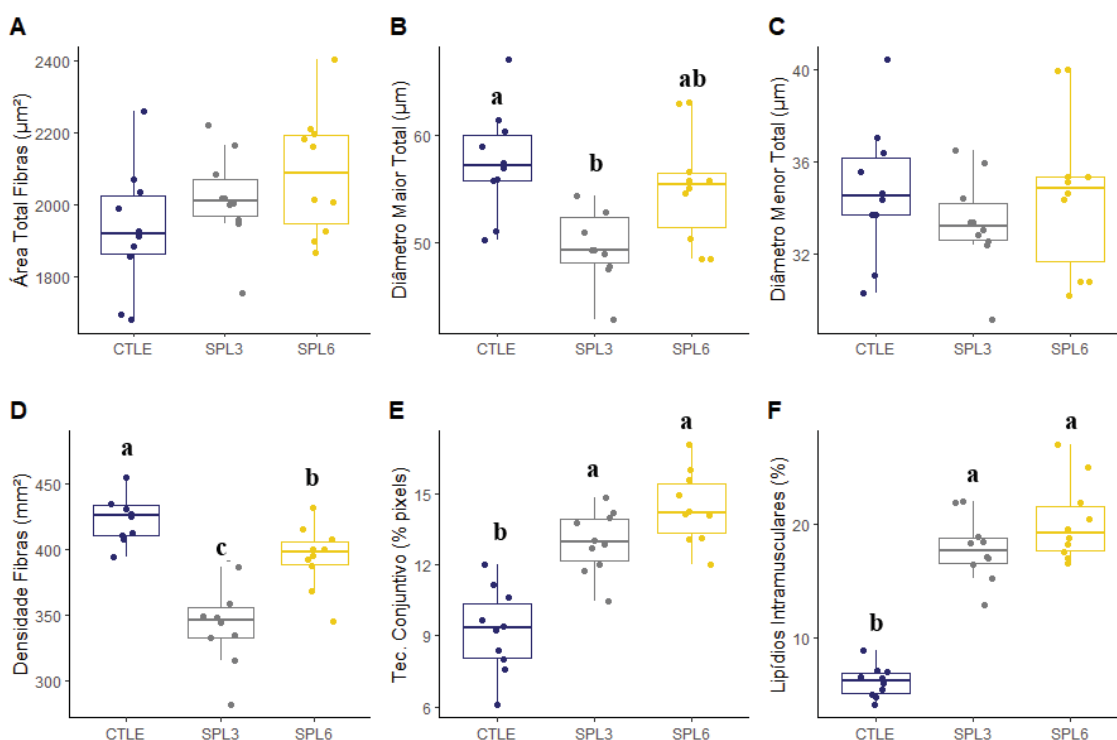


Legenda: CTLE: prole de ratas controle (A, D, G, J); SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg (B, E, H, K); SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg (C, F, I, L). Criosecções transversais em 7 μ m submetidas a coloração de Hematoxilina e Eosina para as análises morfológicas e morfométricas (A-C), a reação de NADH-TR para a tipagem de fibras (D-F), coloração de Sudan Black para a quantificação de lipídios intramusculares (G-I) e Tricrômico de Masson para a quantificação de tecido conjuntivo (J-L). Setas pretas: capilares sanguíneos; Círculos pretos: mionúcleos; I, IIA e IIB: fibras oxidativas, intermediárias e glicolíticas; Paralelogramos pretos: gotículas lipídicas; Setas brancas: tecido conjuntivo.

Ao avaliar a mensuração das fibras do músculo plantar, não houve diferença na Área de Secção Transversa ($F_{2,27} = 2,412$; $p = 0,1077$; $CV = 7,89\%$; Figura 41A) e no Diâmetro Menor ($F_{2,27} = 0,7204$; $p = 0,4956$; $CV = 8,38\%$; Figura 41C) entre os grupos. Contudo, houve redução no Diâmetro Menor ($F_{2,27} = 5,851$; $p = 0,0077$; $CV = 8,88\%$; Figura 41B) nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários. Da mesma forma, houve redução na Densidade de Fibras ($F_{2,27} = 20,929$; $p < 0,0001$; $CV = 7,34\%$; Figura 41D) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE, também houve redução nas SPL3

quando comparadas às SPL6. Em adição a estas alterações, houve também aumento da formação de Tecido Conjuntivo ($F_{2,27} = 30,257$; $p < 0,0001$; $CV = 12,65\%$; Figura 41E) e da deposição de Lipídios Intramusculares ($\chi^2 = 20,2$; $df = 2$; $p < 0,0001$; Figura 41F) nas proles SPL quando comparadas às CTLE.

Figura 41 - Características Morfométricas do Músculo Plantar

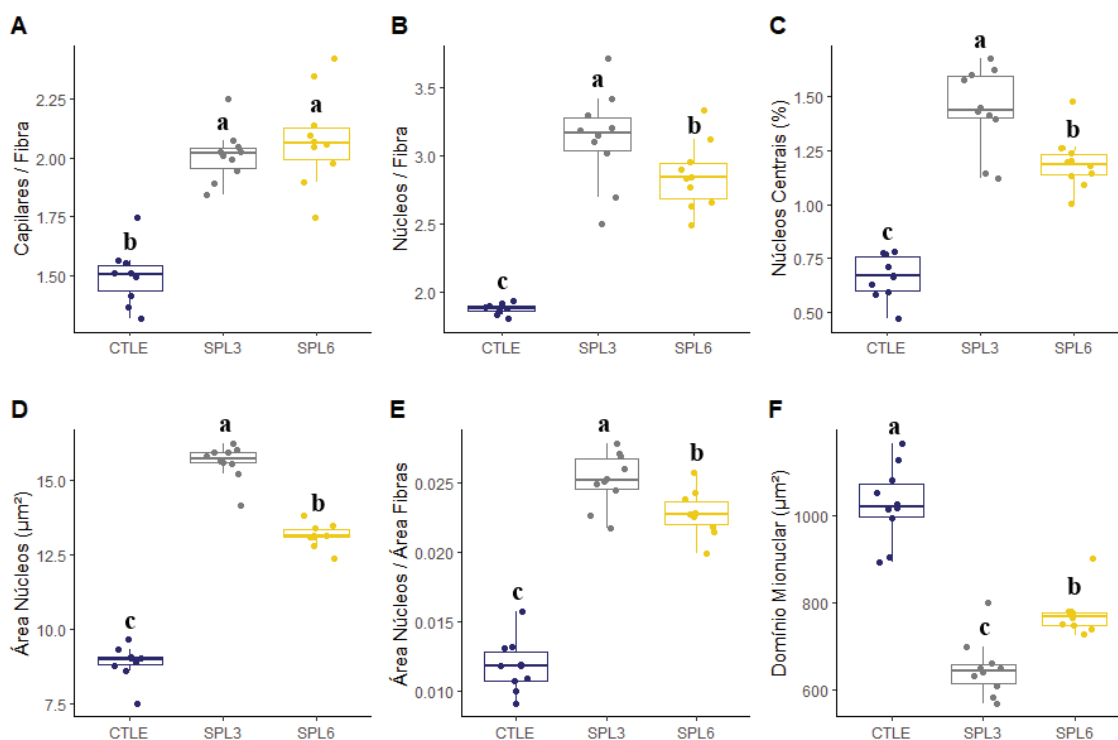


Legenda: Boxplots das variáveis relacionadas com as características morfométricas A: Área de Secção Transversal das Fibras (μm^2); B: Diâmetro Maior das Fibras (μm); C: Diâmetro Menor das Fibras (μm); D: Densidade de Fibras (mm^2); E: Tecido Conjuntivo (% pixels); Lipídios Intramusculares (% pixels) do músculo plantar da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar os capilares e núcleos do músculo plantar, foi possível observar aumento na Razão de Capilares por Fibra ($F_{2,27} = 46,583$; $p < 0,0001$; $CV = 7,9\%$; Figura 42A) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Enquanto isso, houve aumento na Razão de Núcleos por Fibra ($\chi^2 = 21,099$; $df = 2$; $p < 0,0001$; Figura 42B) e nos Núcleos Centrais ($F_{2,27} = 75,937$; $p < 0,0001$; $CV = 13,05\%$; Figura 42C) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE, também houve aumento nas SPL3 quando comparadas às SPL6. Da mesma forma, houve aumento na Área de Secção Transversa dos Núcleos ($\chi^2 = 25,806$; $df = 2$; $p < 0,0001$; Figura 42D) e na Razão de Área de Secção Transversa dos Núcleos pela Área de Secção Transversa da Fibra ($F_{2,27} = 153,86$; $p < 0,0001$; $CV = 9,1\%$; Figura 42E) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE, curiosamente, nas proles SPL3 houve redução destas variáveis quando comparadas às

SPL6. No entanto, houve redução do Domínio Mionuclear ($\chi^2 = 23,414$; $df = 2$; $p < 0.0001$; Figura 42F) nas proles SPL6 e SPL3 quando comparadas às CTLE, de SPL3 quando comparadas às SPL6.

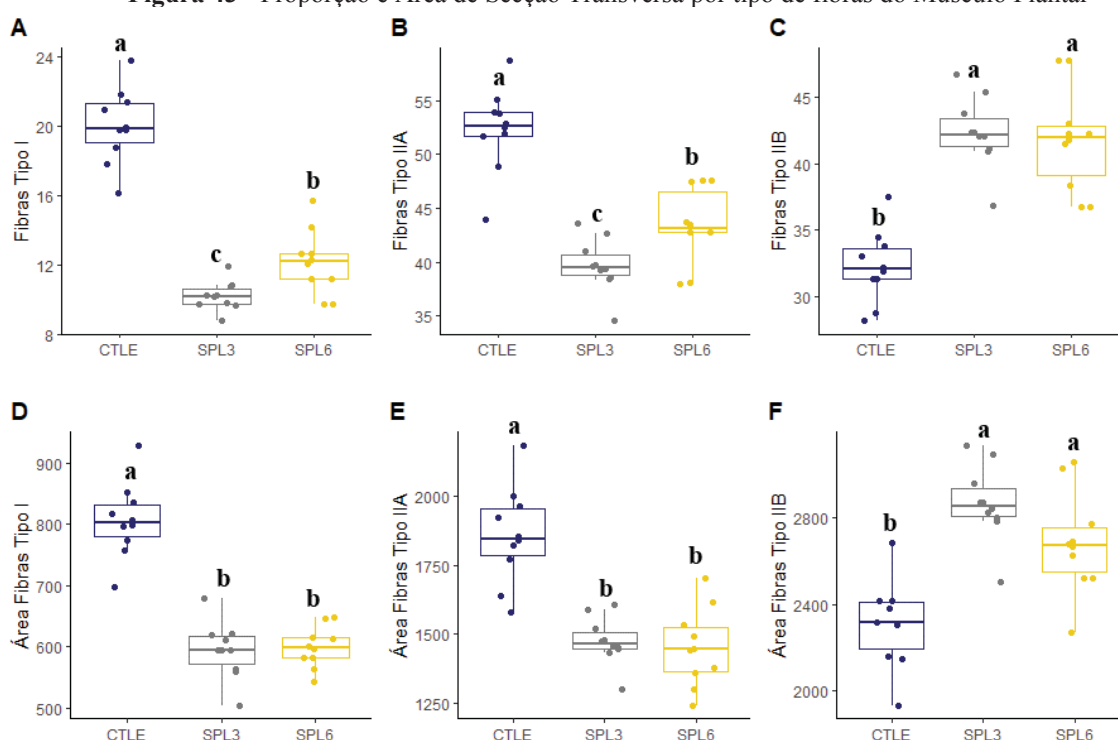
Figura 42 - Variáveis Nucleares e Capilarização do Músculo Plantar



Legenda: Boxplots de A: Razão de Capilares por Fibra; B: Razão de Núcleos por Fibra; C: Núcleos Centrais (%); D: Área de Secção Transversa dos Núcleos (μm^2); E: Razão da Área de Secção Transversa dos Núcleos pela Área de Secção Transversa da Fibra; F: Domínio Mionuclear (μm^2) do músculo plantar da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Ao avaliar a tipagem de fibras do músculo plantar, foi possível observar redução da Proporção de Fibras Tipo I ($F_{2,27} = 93,041$; $p < 0,0001$; $CV = 12,09\%$; Figura 43A) e de Fibras Tipo IIA ($F_{2,27} = 38,104$; $p < 0,0001$; $CV = 7,38\%$; Figura 43B) nas proles SPL6 quando comparadas às CTLE, da mesma forma houve redução nas SPL3 quando comparadas às SPL6. Enquanto isso, houve aumento da Proporção de Fibras Tipo IIB ($F_{2,27} = 32,641$; $p < 0,0001$; $CV = 8,12\%$; Figura 43C) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. Já ao mensurar a Área de Secção Transversa por tipo de fibra, foi possível notar redução na Área das Fibras I ($F_{2,27} = 63,088$; $p < 0,0001$; $CV = 7,24\%$; Figura 43D) e na Área das Fibras IIA ($F_{2,27} = 26,852$; $p < 0,0001$; $CV = 8,73\%$; Figura 43E) nas proles SPL quando comparadas às CTLE. No entanto, houve aumento na Área das Fibras IIB ($F_{2,27} = 19,536$; $p < 0,0001$; $CV = 7,81\%$; Figura 43F) nas proles SPL quando comparadas às CTLE.

Figura 43 - Proporção e Área de Secção Transversa por tipo de fibras do Músculo Plantar



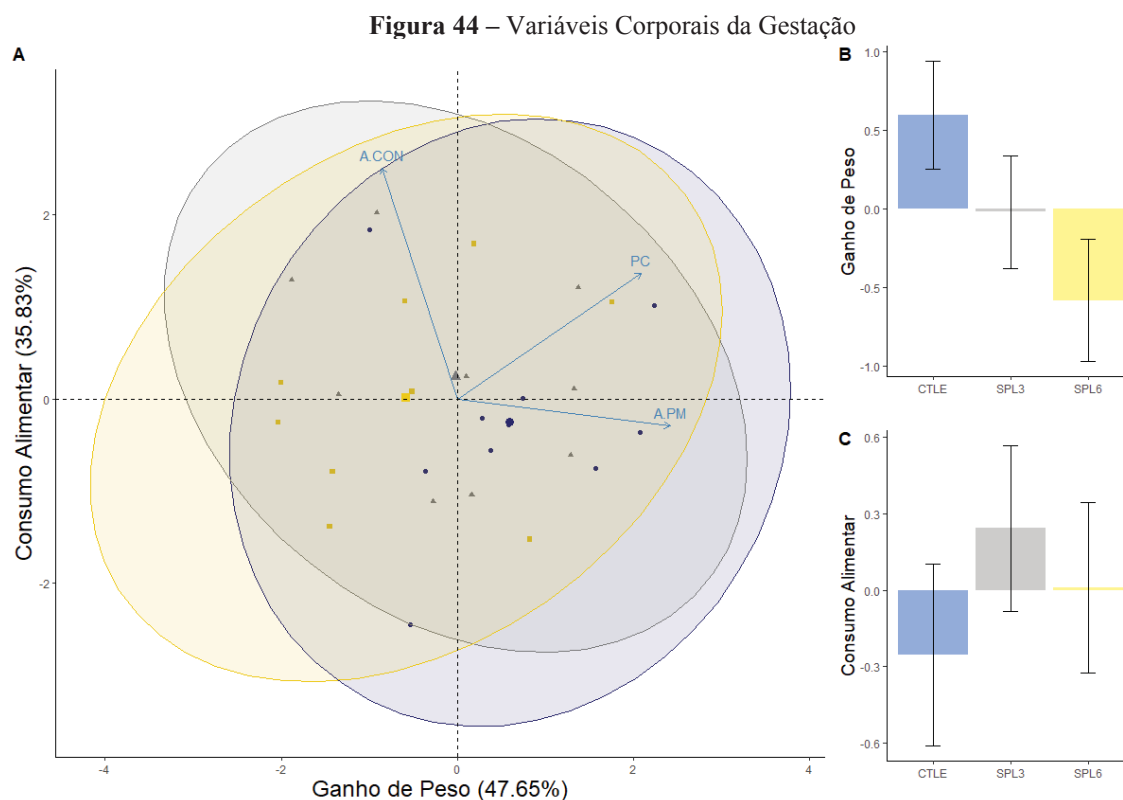
Legenda: Boxplots de A: Proporção de Fibras Tipo I; B: Proporção de Fibras Tipo IIA; C: Proporção de Fibras Tipo IIB; D: Área de Secção Transversa das Fibras Tipo I (μm^2); E: Área de Secção Transversa das Fibras Tipo IIA (μm^2); F: Área de Secção Transversa das Fibras Tipo IIB (μm^2) do músculo plantar da prole de ratas *Wistar* aos 60 dias de vida. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.2.7 Análises de Componentes Principais

Os dois primeiros componentes principais originados em cada matriz de dados são combinações lineares das variáveis originais. As combinações lineares geram novas variáveis estatísticas, denominadas variáveis latentes, as quais apresentam um autovalor (que representa a variância desta nova variável estatística) e autovetores (que representam as cargas fatoriais que contribuem para a formação do componente). Os componentes são considerados ortogonais, ou seja, são independentes entre si, com o propósito de reter, em ordem de importância, o maior valor possível de explicação dos dados. O agrupamento dos indivíduos é realizado conforme sua variação influenciada pelos componentes criados, explicando o comportamento desses indivíduos dentro das características propostas para cada grupo. O deslocamento dos grupos é definido pelas cargas fatoriais (correlação da variável e seu fator determinante) das variáveis mais representativas para aquele agrupamento, sendo fundamental para o entendimento do que está sendo proposto.

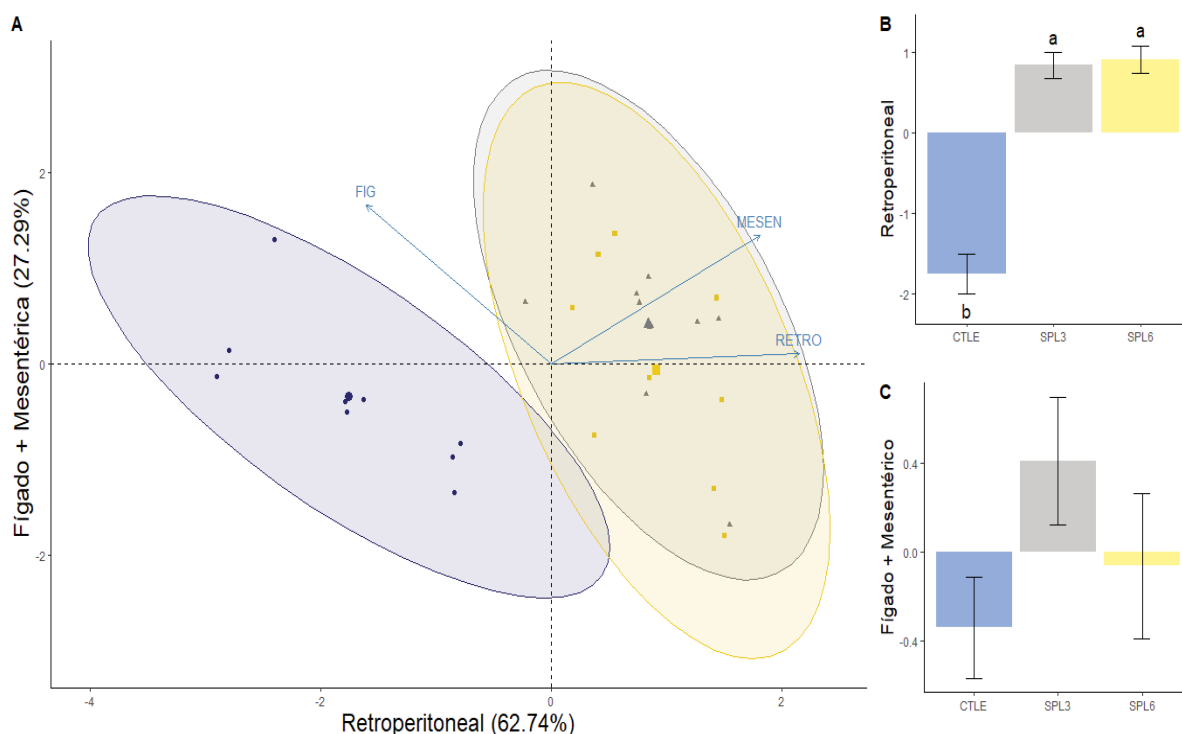
Tratando-se dos Variáveis Corporais da Gestação (Figura 44A), o primeiro componente foi denominado de Ganho de Peso (compreendido pelo Ganho de Peso Total e Peso Corporal;

Autovalor = 1,47; Variabilidade = 47,05%) e o segundo componente denominado de Consumo Alimentar (compreendido pelo Consumo Total; Autovalor = 1,05; Variabilidade = 35,83%). Não foi observada diferença entre os grupos nos dois componentes ($F_{2,27} = 2,606$; $p = 0,092$; $F_{2,27} = 0,537$; $p = 0,591$; Figura 44B e C, respectivamente).



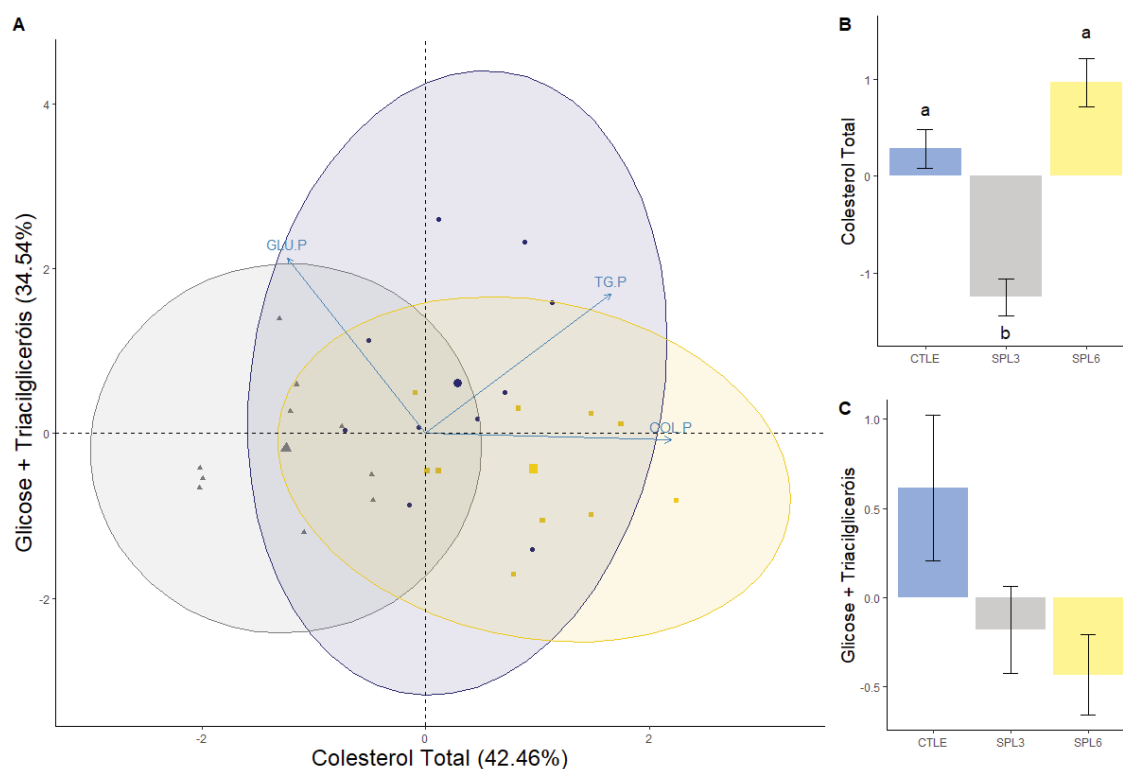
Legenda A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das Variáveis Corporais da Gestação (Ganho de Peso, Peso Corporal e Consumo Alimentar); **B:** Cargas fatoriais da dimensão Ganho de Peso (Ganho de Peso e Peso Corporal); **C:** Cargas fatoriais da dimensão Consumo Alimentar (Consumo Alimentar) de ratas *Wistar* durante o período gestacional e de lactação. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Significância adotada de 95%.

Tratando-se dos Variáveis Corporais ao Desmame (Figura 45A), o primeiro componente foi denominado Retroperitoneal (constituído por Peso do Tecido Adiposo Retroperitoneal; Autovalor = 1,88; Variabilidade = 62,74%) e o segundo componente denominado Fígado + Mesentérico (compreendido o Peso do Fígado e do Tecido Adiposo Mesentérico; Autovalor = 0,82; Variabilidade = 27,29%). Nesta análise, foi observada diferença entre os grupos no componente Retroperitoneal ($F_{2,27} = 60,815$; $p < 0,0001$; Figura 45B), de forma que as progenitoras SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, mostrando que o excesso de AGPIs promoveu influência sobre o depósito de tecido adiposo, distanciando esses animais do padrão encontrado no CTLE. No entanto, não houve diferença entre os grupos no componente Fígado + Mesentérica ($F_{2,27} = 1,781$; $p = 0,188$; Figura 45C).

Figura 45 - Variáveis Corporais ao Desmame

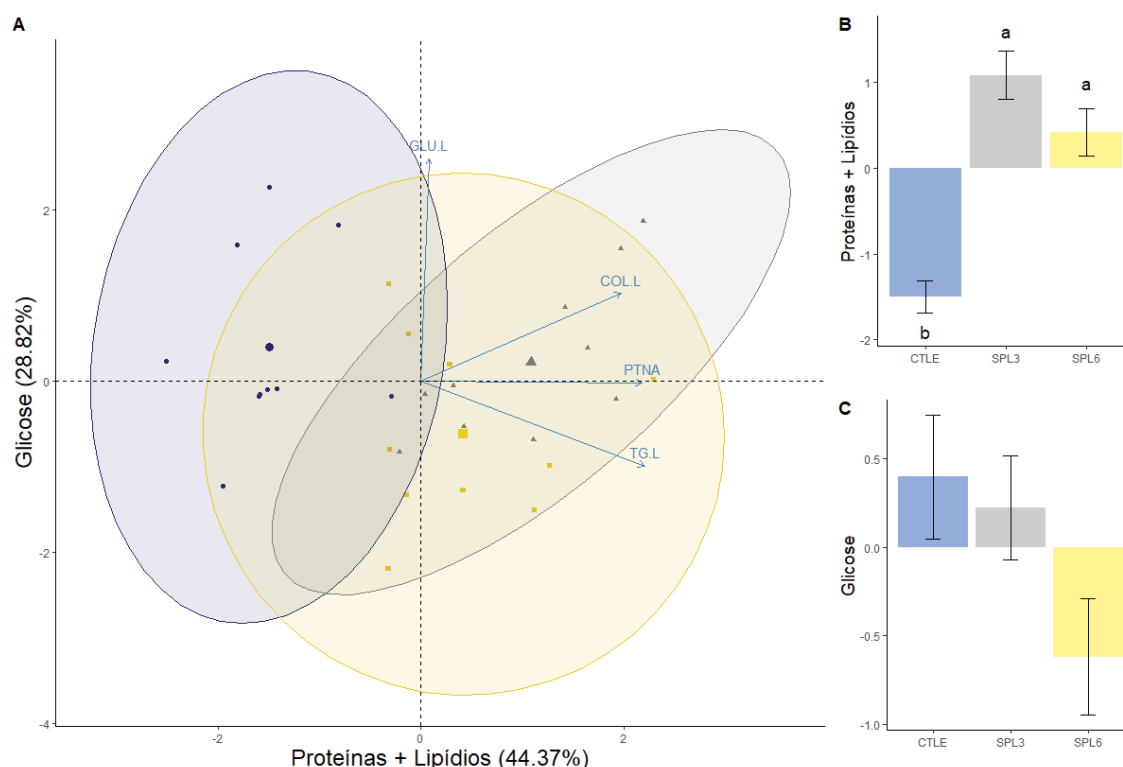
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das Variáveis Corporais ao Desmame (Peso do Fígado e dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico); B: Cargas fatoriais da dimensão Retroperitoneal (Peso do Tecido Adiposo Retroperitoneal); C: Cargas fatoriais da dimensão Fígado + Mesentérico (Peso do Fígado e do Tecido Adiposo Mesentérico) de ratas *Wistar* após o desmame das proles. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Tratando-se do Perfil Bioquímico Plasmático (Figura 46A), o primeiro componente foi denominado de Colesterol Total (constituído pelo Colesterol Total; Autovalor = 1,27; Variabilidade = 42,46%) e o segundo componente denominado de Glicose + Triacilgliceróis (constituído pela Glicose e Triacilgliceróis; Autovalor = 1,04; Variabilidade = 34,54%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Colesterol Total ($F_{2,27} = 27,742$; $p < 0,0001$; Figura 46B), sendo que as progenitoras SPL3 apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE e SPL6, mostrando que o SPL3 promoveu distanciamento, por consequência da redução do colesterol total plasmático, dos grupos CTLE e SPL6. No entanto, não houve diferença entre os grupos no componente Glicose + Triacilgliceróis ($F_{2,27} = 3,214$; $p = 0,056$; Figura 46C).

Figura 46 – Perfil Bioquímico Plasmático

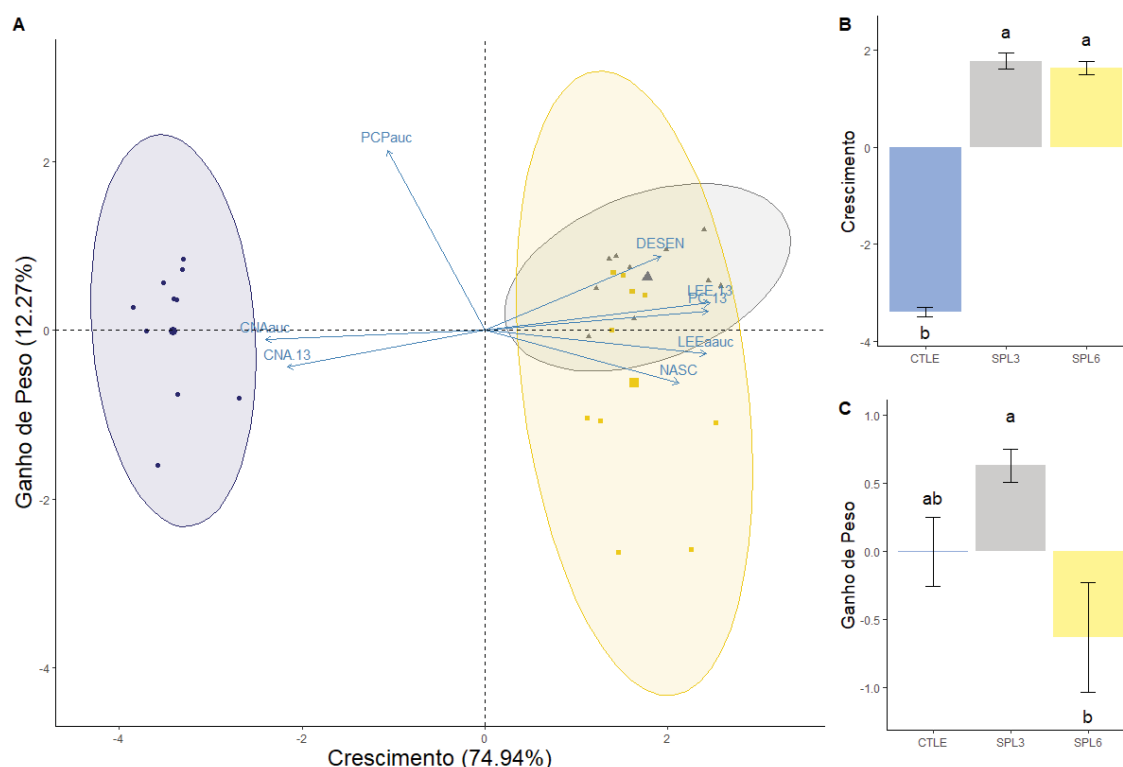
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Perfil Bioquímico Plasmático (Glicose, Triacilgliceróis e Colesterol Total); B: Cargas fatoriais da dimensão Colesterol Total (Colesterol Total); C: Cargas fatoriais da dimensão Glicose + Triacilgliceróis (Glicose + Triacilgliceróis) de ratas *Wistar* após o desmame das proles. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Em relação aos Perfil Bioquímico do Leite (Figura 47A), o primeiro componente foi denominado de Proteína + Lipídios (constituído pelas Proteínas Solúveis, Colesterol Total e Triacilgliceróis; Autovalor = 1,77; Variabilidade = 44,37%) e o segundo componente denominado de Glicemia (constituído pela Glicemia; Autovalor = 1,05; Variabilidade = 22,82%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Proteína + Lipídios ($F_{2,27} = 28,246$; $p < 0,0001$; Figura 47B), sendo que as progenitoras SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, mostrando o efeito do excesso de AGPIs sobre o aporte proteico e lipídico no leite materno, uma vez que as progenitoras SPL apresentaram deslocamento do padrão do CTLE influenciadas por essas variáveis. No entanto, não houve diferença entre os grupos no componente Glicose ($F_{2,27} = 2,787$; $p = 0,079$; Figura 47C).

Figura 47 – Perfil Bioquímico do Leite

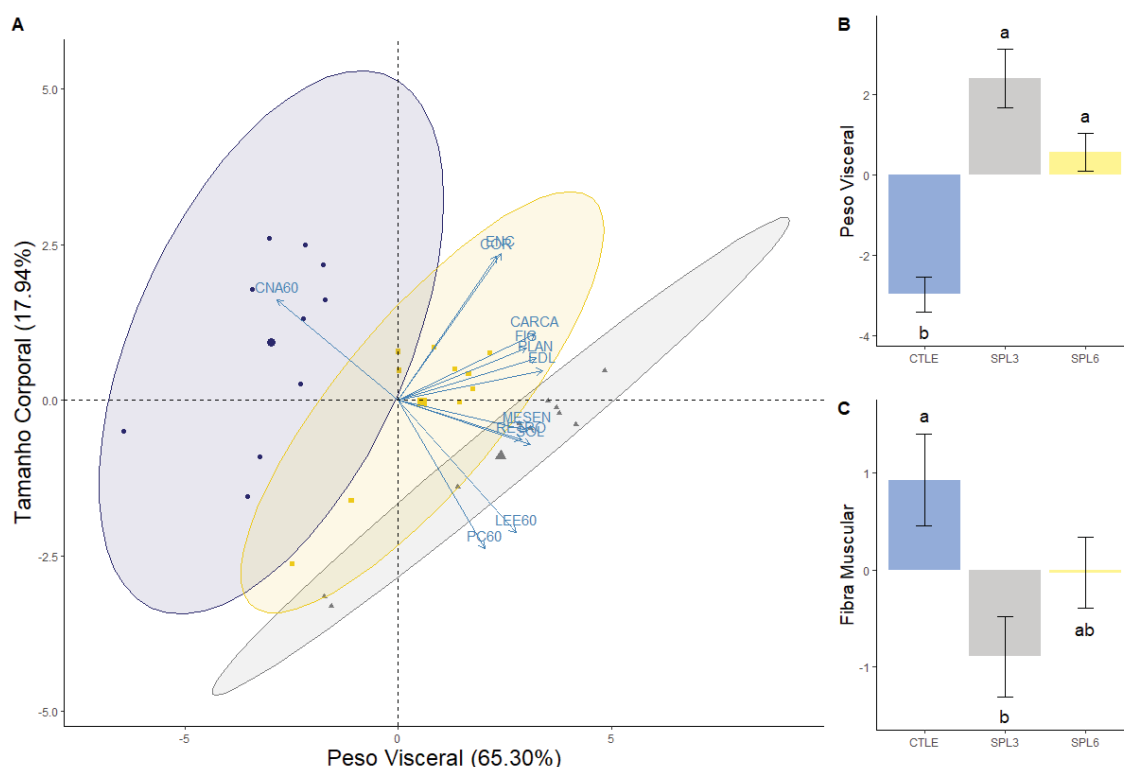
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Perfil Bioquímico do Leite (Glicose, Triacilgliceróis, Colesterol Total e Proteínas Solúveis); B: Cargas fatoriais da dimensão Proteína + Lipídios (Proteínas Solúveis, Colesterol Total e Triacilgliceróis); C: Cargas fatoriais da dimensão Glicose (Glicose) de ratas *Wistar* após o desmame das proles. CTLE: ratas controle; SPL3: ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Para análise das Variáveis de Desenvolvimento (Figura 48A), o primeiro componente foi denominado de Crescimento (constituído pelo Índice de Lee aos 13 dias, Peso Corporal aos 13 dias, Comprimento Nasoanal aos 13 dias, Ganho do Índice de Lee Total, Ganho de Comprimento Nasoanal Total; Autovalor = 6,00; Variabilidade = 74,94%) e o segundo componente denominado de Ganho de Peso (constituído pelo Ganho de Peso Total e Ganho de Peso até o Desmame; Autovalor = 0,98; Variabilidade = 12,27%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Crescimento ($F_{2,27} = 452,36$; $p < 0,0001$; Figura 48B), sendo que as proles SPL apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, mostrando que o excesso de AGPIs durante a gestação e lactação promoveu distanciamento do padrão do CTLE pela redução do crescimento. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Ganho de Peso ($F_{2,27} = 4,9406$; $p = 0,014844$; Figura 48C), no entanto houve aumento das cargas fatoriais nas proles SPL3 quando comparadas às SPL6, enquanto as CTLE apresentaram valores intermediários e não sendo diferente dos demais grupos,

Figura 48 - Variáveis do Desenvolvimento

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das Variáveis de Desenvolvimento (Peso no Nascimento, Peso Corporal aos 13 dias, Comprimento Nasoanal aos 13 dias, Índice de Lee aos 13 dias, Ganho de Peso até o desmame, Ganho de Peso Total, Ganho de Comprimento Nasoanal Total, Ganho de Índice de Lee Total); B: Cargas fatoriais da dimensão Crescimento (Índice de Lee aos 13 dias, Peso Corporal aos 13 dias, Comprimento Nasoanal aos 13 dias, Ganho do Índice de Lee Total, Ganho de Comprimento Nasoanal Total); C: Cargas fatoriais da dimensão Ganho de Peso (Ganho de Peso Total e Ganho de Peso até o Desmame) da prole de ratas *Wistar* após o desmame. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

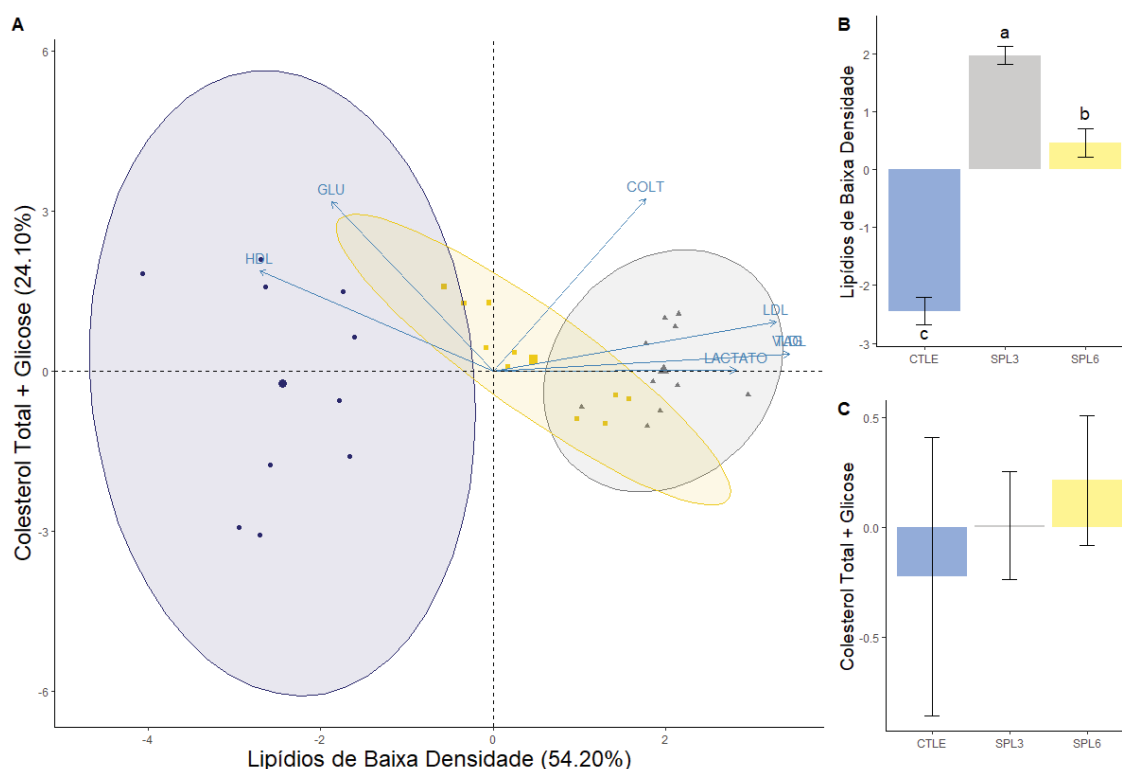
Tratando-se das Variáveis Corporais (Figura 49A), o primeiro componente foi denominado de Peso Visceral (constituído pelo Peso dos Músculos Extensor Longo dos Dedos, Plantar e Sóleo, Peso da Carcaça, Fígado e Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico; Autovalor = 7,8; Variabilidade = 65,30%) e o segundo componente denominado de Tamanho Corporal (Comprimento Nasoanal, Índice de Lee, Peso Corporal, Peso do Encéfalo e Coração; Autovalor = 2,15; Variabilidade = 17,94%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Peso Visceral ($F_{2,27} = 23,827$; $p < 0,0001$; Figura 49B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, mostrando que o aumento do peso visceral nas proles SPL apresentaram grande influência para o distanciamento desses animais do CTLE. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Tamanho Corporal ($F_{2,27} = 4,6925$; $p = 0,017822$; Figura 49C), no entanto houve redução das cargas fatoriais nas proles SPL3 quando comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários não sendo diferente dos outros grupos.

Figura 49 – Variáveis Corporais

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das Variáveis Corporais (Peso Corporal, Comprimento Nasoanal, Índice de Lee, Peso do Fígado, Encéfalo, Coração, Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico e Músculos Sóleo, Extensor Longo dos Dedos e Plantar); B: Cargas fatoriais da dimensão Peso Visceral (Peso dos Músculos Extensor Longo dos Dedos, Plantar e Sóleo, Peso da Carcaça, Fígado e Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico); C: Cargas fatoriais da dimensão Tamanho Corporal (Comprimento Nasoanal, Índice de Lee, Peso Corporal, Peso do Encéfalo e Coração) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

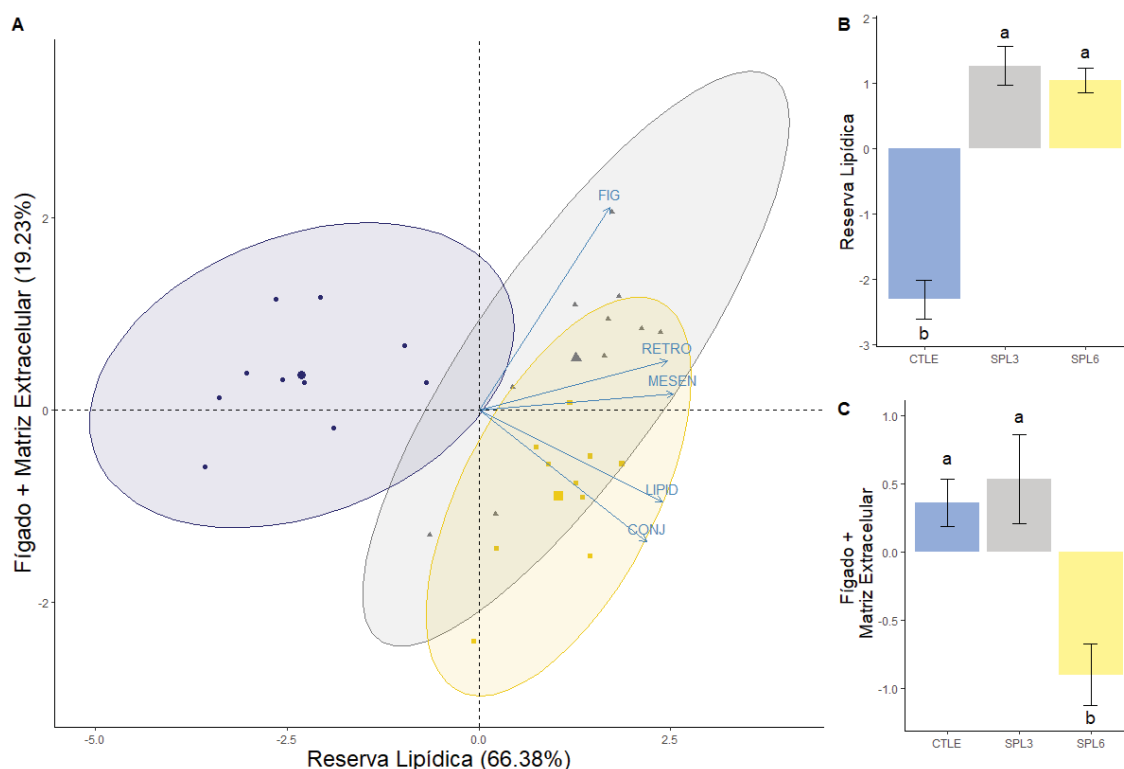
Considerando o Perfil Bioquímico Plasmático (Figura 50A), o primeiro componente foi denominado de Lipídios de Baixa Densidade (composto pelos Triacilgliceróis, Colesteróis LDL e VLDL; Autovalor = 3,79; Variabilidade = 54,20%) e o segundo componente denominado de Colesterol Total + Glicose (composto pelo Colesterol Total e Glicose; Autovalor = 1,69; Variabilidade = 24,10%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Lipídios de Baixa Densidade ($F_{2,27} = 105,94$; $p < 0,0001$; Figura 50B), sendo que as proles SPL3 apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às SPL6, enquanto as proles SPL6 apresentaram maiores valores que as CTLE, associando as alterações ao aumento do aporte lipídico plasmático nessas proles. No entanto, não houve diferença entre os grupos no componente Colesterol Total + Glicose ($F_{2,27} = 0,26176$; $p = 0,7716$; Figura 50C).

Figura 50 – Perfil Bioquímico Plasmático



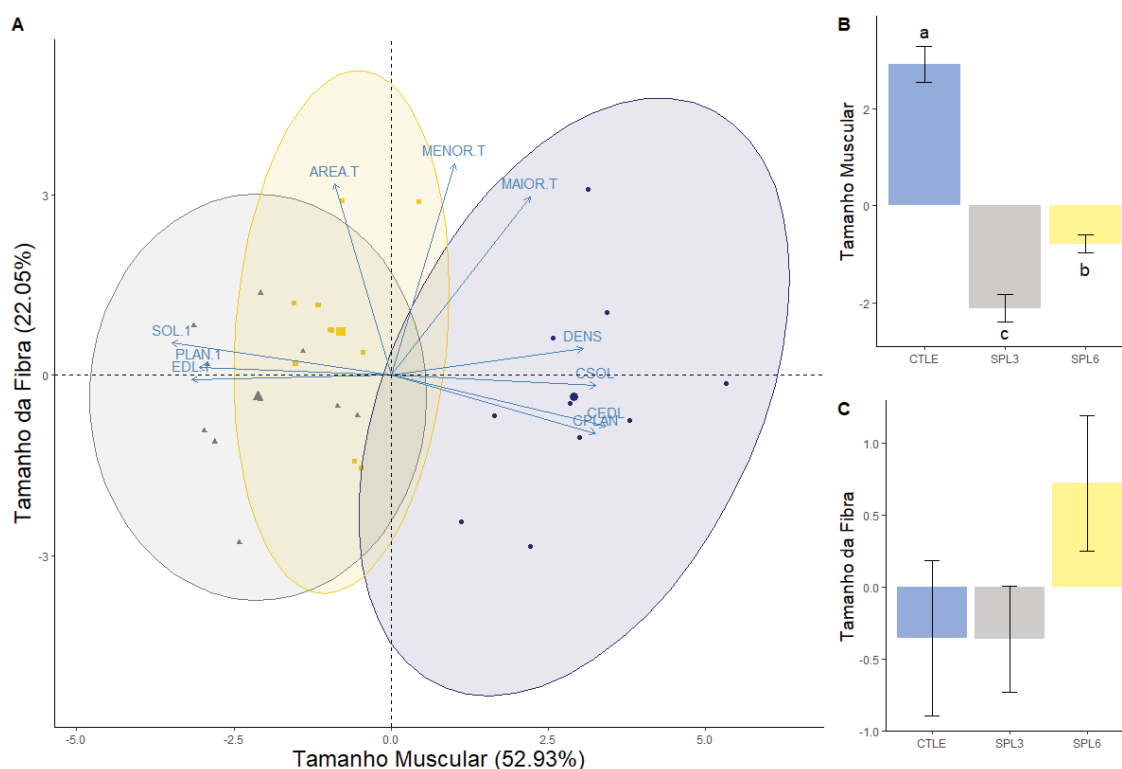
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Perfil Bioquímico do Plasma (Glicose, Triacilgliceróis, Colesteróis Totais, HDL, LDL e VLDL e Lactato); B: Cargas fatoriais da dimensão Lipídios de Baixa Densidade (Triacilgliceróis, Colesteróis LDL e VLDL); C: Cargas fatoriais da dimensão Colesterol Total + Glicose (Colesterol Total e Glicose) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Para análise das Características Mesenquimais (Figura 51A), o primeiro componente foi denominado de Reservas Lipídicas (constituído pelos Lipídios Intramusculares e Peso dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico; Autovalor = 3,03; Variabilidade = 66,38%) e o segundo componente denominado de Fígado + Matriz Extracelular (constituído pelo Tecido Conjuntivo Muscular e Peso do Fígado; Autovalor = 0,45; Variabilidade = 19,23%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Reserva Lipídica ($F_{2,27} = 55,56$; $p < 0,0001$; Figura 51B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, sendo possível observar uma forte influência do aumento das reservas para o distanciamento dos animais SPL do padrão do CTLE. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Fígado + Matriz Extracelular ($F_{2,27} = 9,9$; $p = 0,0006$; Figura 51C) no entanto, houve redução das cargas fatoriais das proles SPL6 quando comparadas às SPL3 e CTLE, sendo principalmente pela maior prevalência de tecido conjuntivo, deslocando esses animais das características encontradas no CTLE e SPL3.

Figura 51 – Características Mesenquimais

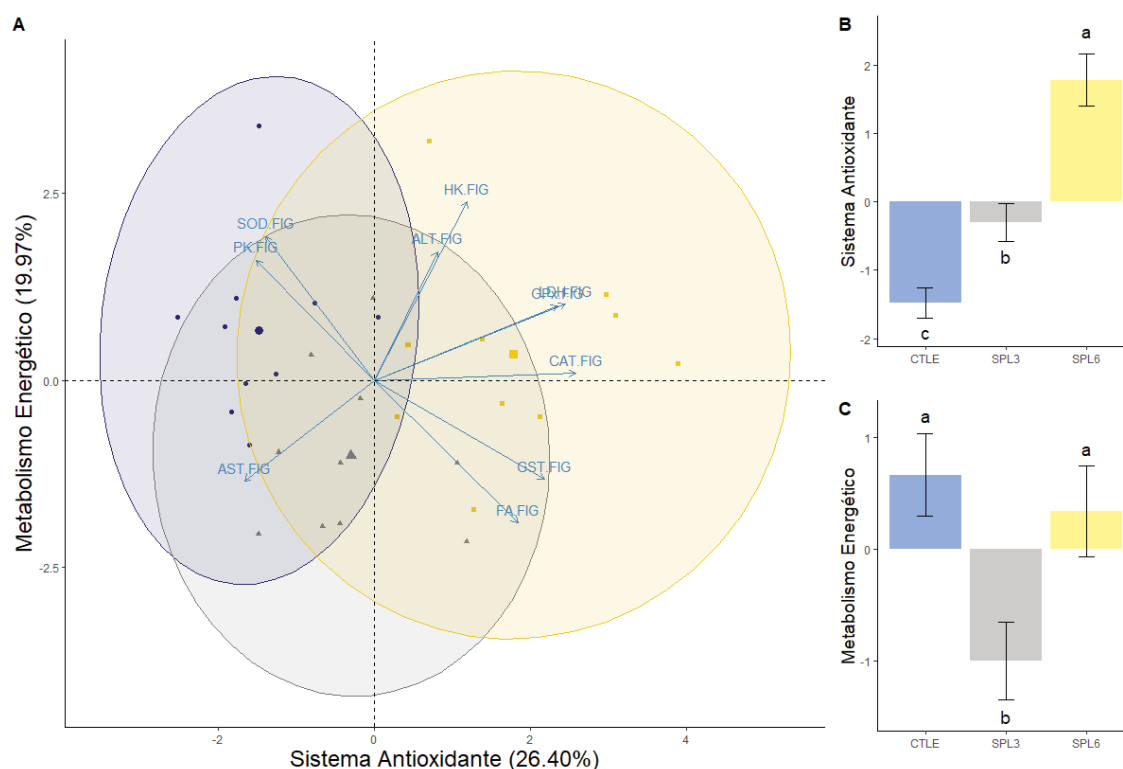
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes às Características Mesenquimais (Peso dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico, Peso do Fígado, Acúmulo de Lipídios Intramusculares e Percentual de Tecido Conjuntivo Muscular); B: Cargas fatoriais da dimensão Reserva Lipídica (Lipídios Intramusculares e Peso dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico); C: Cargas fatoriais da dimensão Figado + Matriz Extracelular (Tecido Conjuntivo Muscular e Peso do Fígado) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Tratando-se das Características Musculares (Figura 52A), o primeiro componente foi denominado de Tamanho Muscular (constituído pelo Peso e Comprimento dos Músculos Sóleo, Plantar e Extensor Longo dos Dedos, Densidade de Fibras; Autovalor = 5,29; Variabilidade = 52,93%) e o segundo componente denominado de Tamanho da Fibra (constituído pela Área de Secção Transversa Total e Diâmetros Maior e Menor Totais; Autovalor = 2,20; Variabilidade = 22,05%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Tamanho Muscular ($F_{2,27} = 79,314$; $p < 0,0001$; Figura 52B), sendo que as proles SPL6 apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, assim como as proles SPL3 apresentaram menores valores quando comparadas às SPL6. Contudo, não houve diferença entre os grupos no componente Tamanho da Fibra ($F_{2,27} = 1,8087$; $p = 0,1831$; Figura 52C), mostrando que independente da redução do tamanho muscular promovido pelo excesso de AGPIs, de forma geral não houve alteração no tamanho das fibras musculares.

Figura 52 – Características Musculares

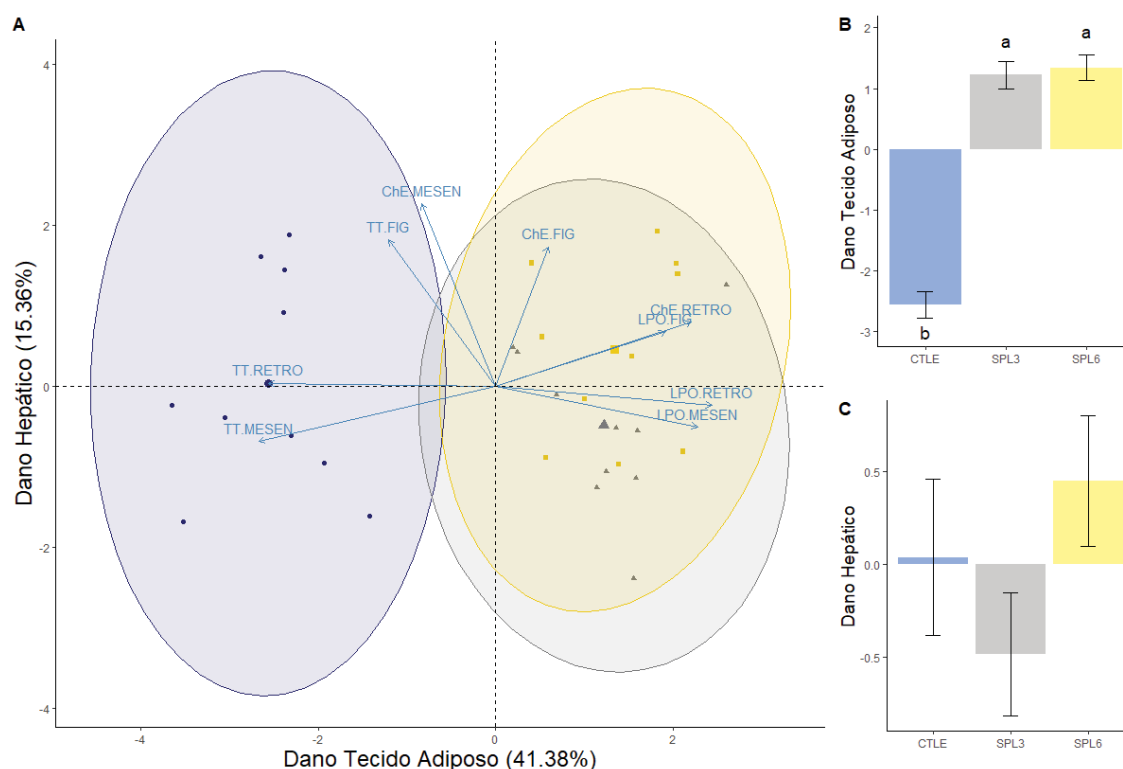
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes às Características Musculares (Peso e Comprimento dos Músculos Sóleo, Plantar e Extensor Longo dos Dedos, Densidade de Fibras, Área de Secção Transversal Total, Diâmetros Maior e Menor Totais); B: Cargas fatoriais da dimensão Tamanho da Fibra (Área de Secção Transversal Total e Diâmetros Maior e Menor Totais); C: Cargas fatoriais da dimensão Tamanho da Fibra (Área de Secção Transversal Total e Diâmetros Maior e Menor Totais) da prole de ratos *Wistar*. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Com relação à Atividade Bioquímica Hepática (Figura 53A), o primeiro componente foi denominado de Sistema Antioxidante (constituído pela atividade da CAT, GPx, GST e LDH; Autovalor = 2,64; Variabilidade = 41,38%) e o segundo componente denominado de Metabolismo Energético (constituído pela atividade da HK, ALP, ALT, PK, SOD; Autovalor = 1,80; Variabilidade = 15,36%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Sistema Antioxidante ($F_{2,27} = 29,886$; $p < 0,0001$; Figura 53B), sendo que as proles SPL6 apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às SPL3, também as proles CTLE apresentaram menores valores quando comparadas às SPL3, mostrando que as alterações lipídicas promoveram distanciamento do padrão encontrado no CTLE, justificado pelo aumento da atividade do sistema antioxidante. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Metabolismo Energético ($F_{2,27} = 5,521$; $p = 0,0097$; Figura 53C) com as proles SPL3 apresentando menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE e SPL6.

Figura 53 – Atividade Bioquímica Hepática

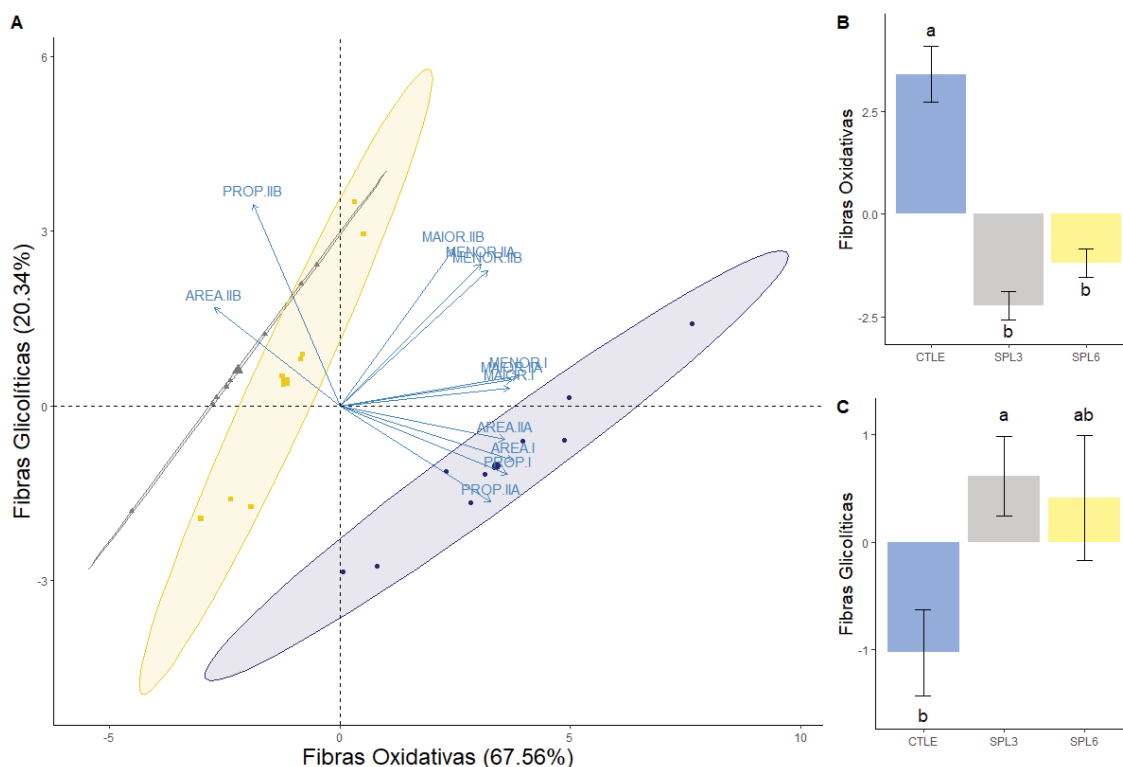
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes à Atividade Bioquímica Hepática (Atividade da HK, PK, LDH, AST, ALT, ALP, SOD, CAT, GPx, GST); B: Cargas fatoriais da dimensão Sistema Antioxidante (Atividade da CAT, GPx, GST e LDH); C: Cargas fatoriais da dimensão Energético (Atividade da HK, ALP, ALT, PK, SOD) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Na análise dos Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos (Figura 54A), o primeiro componente foi denominado de Dano Tecido Adiposo (constituído pela LPO, NP-SH e ChE dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico; Autovalor = 3,72; Variabilidade = 41,38%) e o segundo componente denominado de Dano Hepático (constituído pela LPO, NP-SH e ChE do Fígado; Autovalor = 1,38; Variabilidade = 15.36%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Dano Tecido Adiposo ($F_{2,27} = 102,63$; $p < 0,0001$; Figura 54B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, evidenciando que o aumento do depósito lipídico pode estar relacionado com o aumento dos danos oxidativos sofrido pelas proles SPL. Contudo, no que trata do componente Dano Hepático não houve diferença entre os grupos ($F_{2,27} = 1,6107$; $p = 0,21836$; Figura 54C).

Figura 54 - Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes aos Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos (LPO, NP-SH e ChE do Fígado e Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico); B: Cargas fatoriais da dimensão Dano Tecido Adiposo (LPO, NP-SH e ChE dos Tecidos Adiposos Retroperitoneal e Mesentérico); C: Cargas fatoriais da dimensão Dano Hepático (LPO, NP-SH e ChE do Fígado) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

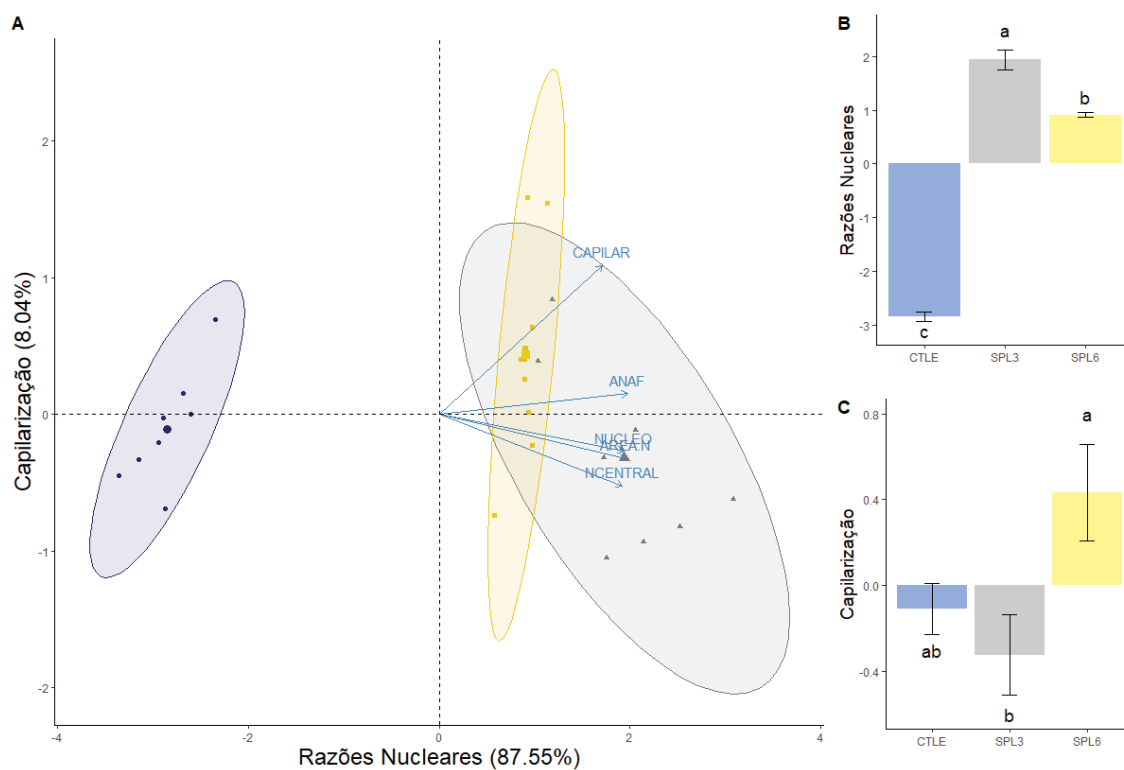
Para análise da Caracterização dos Tipos de Fibras (Figura 55A), o primeiro componente foi denominado de Fibras Oxidativas (constituído pelos Diâmetros Menor e Maior, Área de Secção Transversa e Proporção de Fibras Tipo I e Área de Fibras Tipo IIA; Autovalor = 8,11; Variabilidade = 67,56%) e o segundo componente denominado de Fibras Glicolíticas (constituído pelos Diâmetros Maior e Menor, Área de Secção Transversa e Proporção de Fibras Tipo IIA e IIB; Autovalor = 2,44; Variabilidade = 20,34%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Fibras Oxidativas ($F_{2,27} = 37,534$; $p < 0,0001$; Figura 55B), sendo que as proles SPL apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Fibras Glicolíticas ($F_{2,27} = 3,7744$; $p = 0,0358$; Figura 54C) sendo que as proles SPL3 apresentaram maiores valores comparadas às CTLE, enquanto as SPL6 apresentaram valores intermediários. Essa compensação do tamanho e proporção de fibras justifica a alteração no tamanho muscular e a não mudança no tamanho das fibras musculares totais.

Figura 55 - Caracterização dos Tipos de Fibras

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes à Caracterização do Tipo de Fibras (Área de Secção Transversa, Diâmetros Maior e Menor e Proporção de Fibras Tipo I, IIA e IIB); B: Cargas fatoriais da dimensão Fibras Oxidativas (Diâmetros Menor e Maior, Área de Secção Transversa e Proporção de Fibras Tipo I e Área de Fibras Tipo IIA); C: Cargas fatoriais da dimensão Fibras Glicolíticas (Diâmetros Maior e Menor, Área de Secção Transversa e Proporção de Fibras Tipo IIA e IIB) da prole de ratos *Wistar*. CTLE: prole de ratos controle; SPL3: prole de ratos suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratos suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

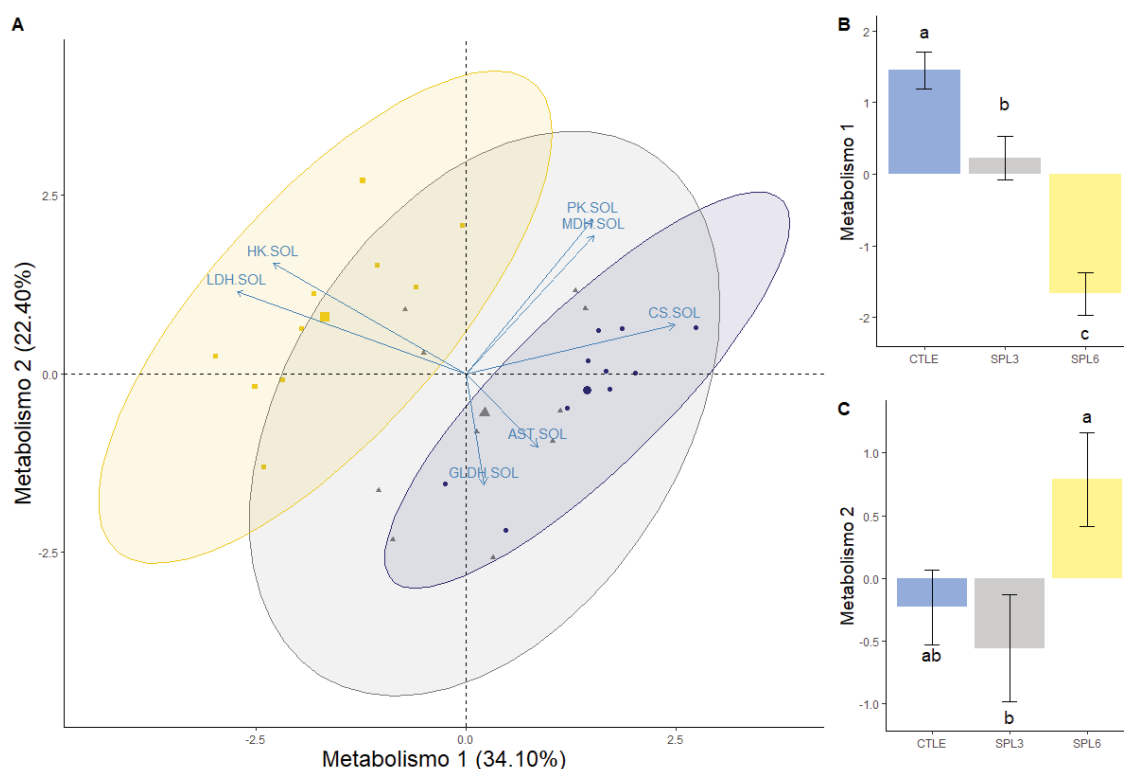
No tocante à Distribuição Capilar e Nuclear (Figura 56A), o primeiro componente foi denominado de Razões Nucleares (constituído pela Área de Núcleo por Área de Fibra, Área de Secção Transversa Nuclear, Razão de Núcleos por Fibras e Núcleos Centrais; Autovalor = 8,11; Variabilidade = 87,55%) e o segundo componente denominado de Capilarização (constituído pela Razão de Capilares por Fibra; Autovalor = 2,44; Variabilidade = 8,04%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Razões Nucleares ($F_{2,27} = 425,85$; $p < 0,0001$; Figura 56B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, sendo que os animais SPL3 apresentaram ainda maiores valores que os SPL6. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Capilarização ($F_{2,27} = 4,5455$; $p = 0,0198$; Figura 56C) sendo que as proles SPL3 apresentaram menores valores comparadas às SPL6, enquanto as CTLE apresentaram valores intermediários. Mostrando que o excesso de AGPIs promove distanciamento do padrão do CTLE, aumentando a distribuição nuclear e a capilarização nos grupos SPL.

Figura 56 - Distribuição Capilar e Nuclear



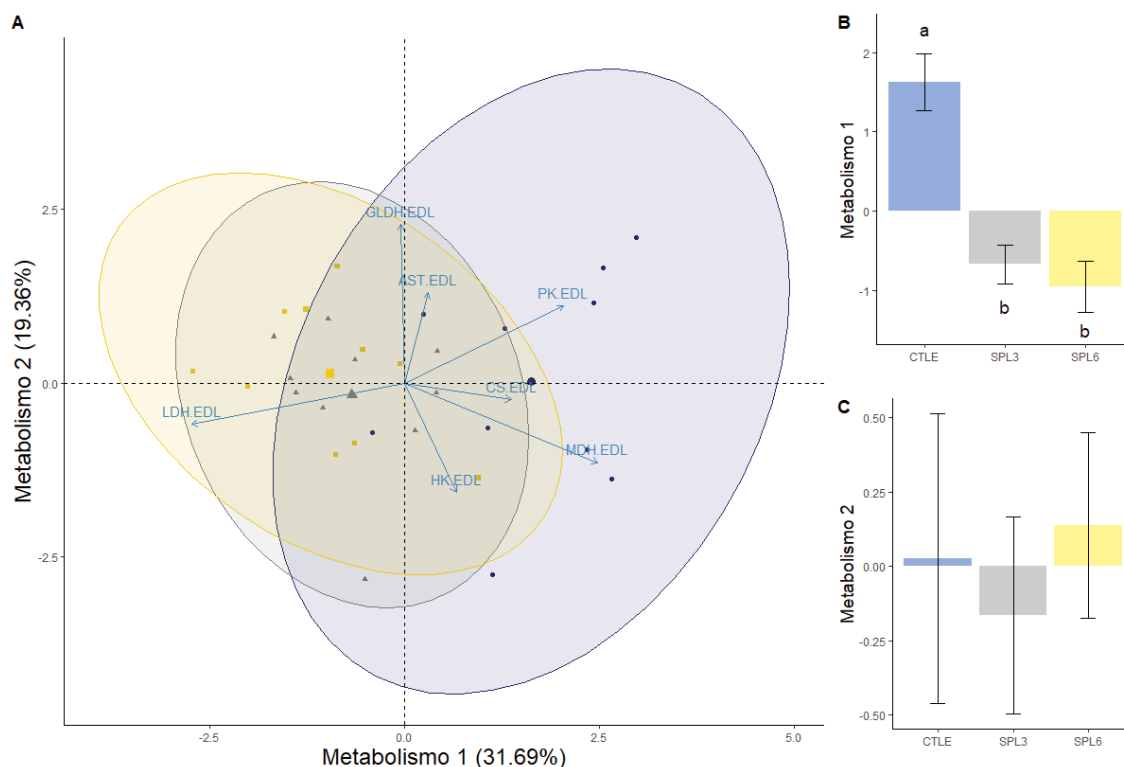
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes à Distribuição Capilar e Nuclear (Razão de Capilares por Fibra, Razão de Núcleos por Fibras, Área de Secção Transversa Nuclear, Razão da Área Nuclear pela Área da Fibra, Percentual de Núcleos Centrais); B: Cargas fatoriais da dimensão Razões Nucleares (Área de Núcleo por Área de Fibra, Área de Secção Transversa Nuclear, Razão de Núcleos por Fibras e Núcleos Centrais); C: Cargas fatoriais da dimensão Capilarização (Razão de Capilares por Fibra) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

No quesito Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Sóleo (Figura 57A), o primeiro componente foi denominado de Metabolismo 1 (constituído pela atividade da LDH, CS e HK; Autovalor = 2,39; Variabilidade = 34,10%) e o segundo componente denominado de Metabolismo 2 (constituído pela atividade da PK, MDH e GLDH; Autovalor = 1,37; Variabilidade = 22,40%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Metabolismo 1 ($F_{2,27} = 30,102$; $p < 0,0001$; Figura 57B), sendo que as proles SPL3 apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE, sendo que os animais SPL6 apresentaram valores ainda menores que os SPL3. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Metabolismo 2 ($F_{2,27} = 3,5808$; $p = 0,0417$; Figura 57C) sendo que as proles SPL3 apresentaram valores menores quando comparadas às SPL6, enquanto as CTLE apresentaram valores intermediários. Nesse sentido, a suplementação em excesso foi responsável pelo aumento gradativo do metabolismo anaeróbico.

Figura 57 - Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Sóleo

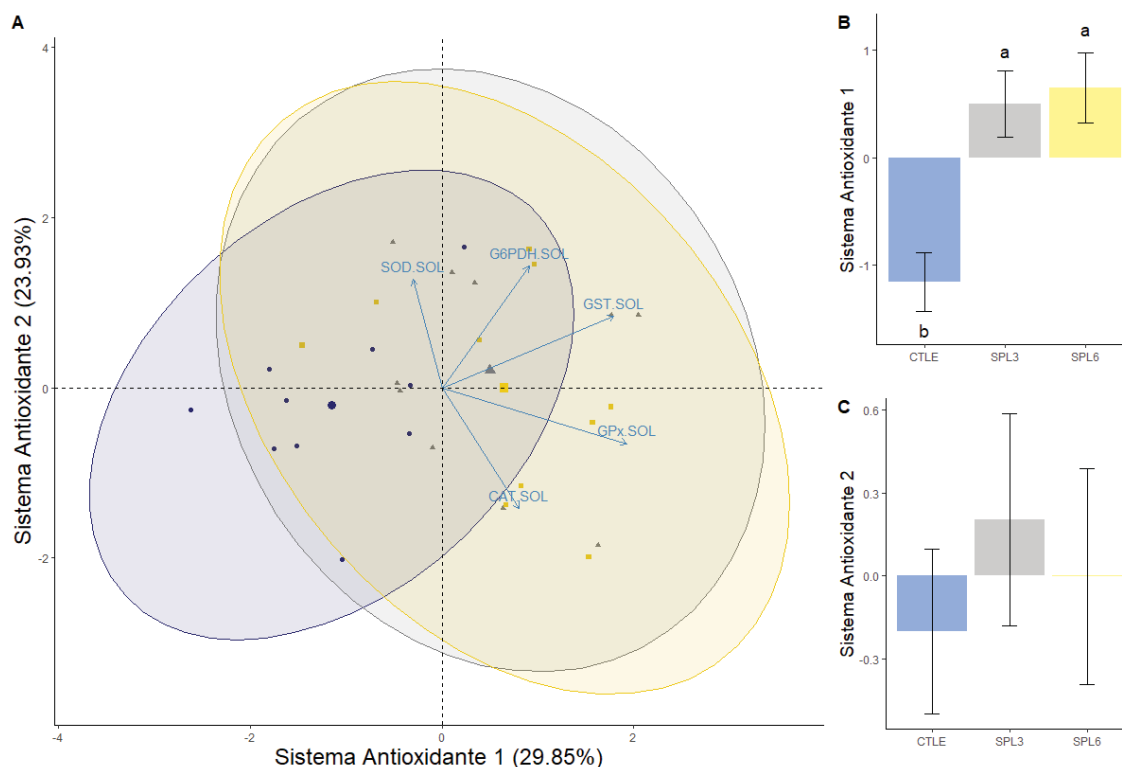
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Metabolismo Energético do Músculo Sóleo (Atividade da HK, PK, LDH, CS, MDH, AST e GLDH); B: Cargas fatoriais da dimensão Metabolismo 1 (Atividade da LDH, CS e HK); C: Cargas fatoriais da dimensão Metabolismo 2 (Atividade da PK, MDH e GLDH) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Tratando-se da Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos (Figura 58A), o primeiro componente foi denominado de Metabolismo 1 (constituído pela atividade da LDH, MDH e PK; Autovalor = 2,22; Variabilidade = 31,69%) e o segundo componente denominado de Metabolismo 2 (constituído pela atividade da GLDH, HK e AST; Autovalor = 1,36; Variabilidade = 19,36%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Metabolismo 1 ($F_{2,27} = 20,486$; $p < 0,0001$; Figura 58B), sendo que as proles SPL apresentaram menores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Contudo, não houve diferença entre os grupos no componente Metabolismo 2 ($F_{2,27} = 0,158$; $p = 0,854$; Figura 58C).

Figura 58 - Atividade do Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos

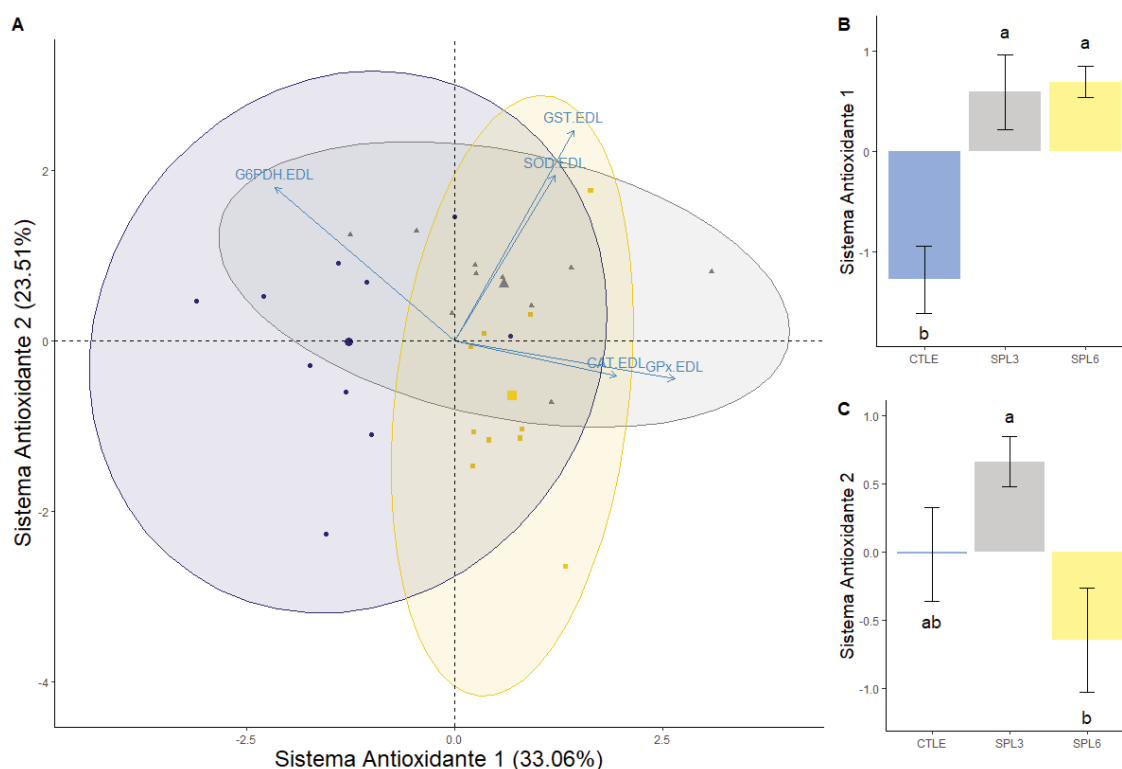
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Metabolismo Energético do Músculo Extensor Longo dos Dedos (Atividade da HK, PK, LDH, CS, MDH, AST e GLDH); B: Cargas fatoriais da dimensão Metabolismo 1 (Atividade da LDH, MDH e PK); C: Cargas fatoriais da dimensão Metabolismo 2 (Atividade da GLDH, HK e AST) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Tratando-se da Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Sóleo (Figura 59A), o primeiro componente foi denominado de Sistema Antioxidante 1 (constituído pela atividade da GPx e GST; Autovalor = 1,49; Variabilidade = 29,85%) e o segundo componente denominado de Sistema Antioxidante 2 (constituído pela atividade da G6PDH, CAT e SOD; Autovalor = 1,20; Variabilidade = 23,93%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Sistema Antioxidante 1 ($F_{2,27} = 10,931$; $p = 0,0003$; Figura 59B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Contudo, não houve diferença entre os grupos no componente Sistema Antioxidante 2 ($F_{2,27} = 0,32746$; $p = 0,7306$; Figura 59C).

Figura 59 – Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Sóleo

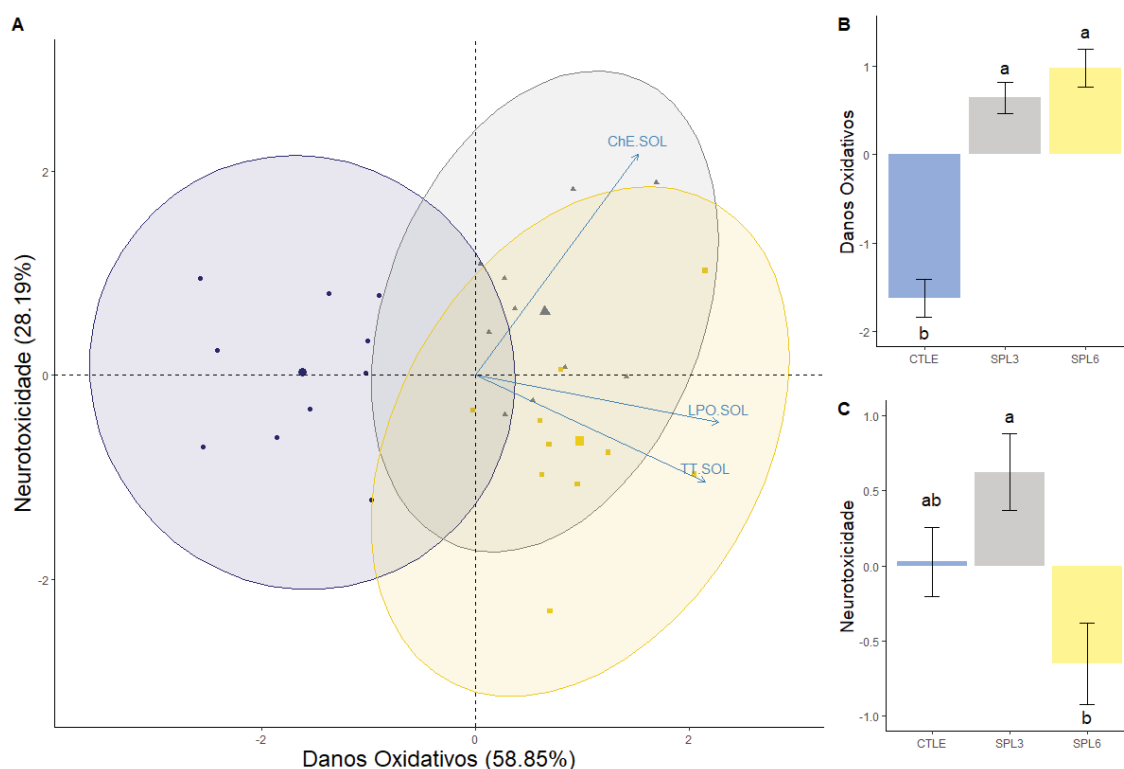
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Sistema Antioxidante do Músculo Sóleo (Atividade da SOD, CAT, GPx, GST, G6PDH); B: Cargas fatoriais da dimensão Sistema Antioxidante 1 (Atividade da GPx e GST); C: Cargas fatoriais da dimensão Sistema Antioxidante 2 (Atividade da G6PDH, CAT e SOD) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Com relação à Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Extensor Longo dos Dedos (Figura 60A), o primeiro componente foi denominado de Sistema Antioxidante 1 (constituído pela atividade da GPx, G6PDH e CAT; Autovalor = 1,65; Variabilidade = 33,06%) e o segundo componente denominado de Sistema Antioxidante 2 (constituído pela atividade da GST, SOD e G6PDH; Autovalor = 1,18; Variabilidade = 23,51%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Sistema Antioxidante 1 ($F_{2,27} = 13,342$; $p < 0,0001$; Figura 60B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Sistema Antioxidante 2 ($F_{2,27} = 4,3071$; $p = 0,02379$; Figura 60C) porém as proles SPL3 apresentaram maiores valores quando comparadas às SPL6, enquanto as proles CTLE apresentaram valores intermediários, mas não são diferentes dos outros grupos.

Figura 60 – Atividade do Sistema Antioxidante do Músculo Extensor Longo dos Dedos

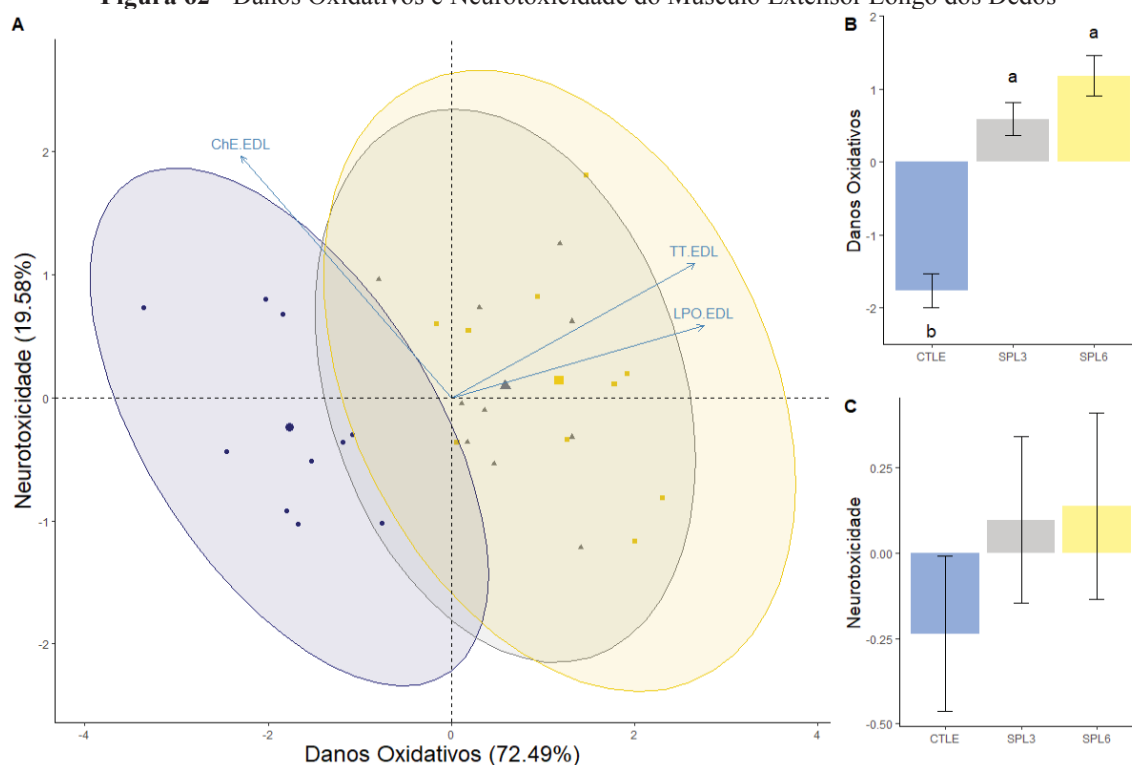
Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes ao Sistema Antioxidante do Músculo Extensor Longo dos Dedos (Atividade da SOD, CAT, GPx, GST, G6PDH); B: Cargas fatoriais da dimensão Sistema Antioxidante 1 (Atividade da GPx, G6PDH e CAT); C: Cargas fatoriais da dimensão Sistema Antioxidante 2 (Atividade da GST, SOD e G6PDH) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Com relação a análise dos Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo (Figura 61A), o primeiro componente foi denominado de Danos Oxidativos (constituído pela LPO e NP-SH; Autovalor = 1,71; Variabilidade = 58,85%) e o segundo componente denominado de Neurotoxicidade (constituído pela atividade da ChE; Autovalor = 0,85; Variabilidade = 28,19%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Danos Oxidativos ($F_{2,27} = 49,115$; $p < 0,0001$; Figura 61B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Da mesma forma, houve diferença entre os grupos no componente Neurotoxicidade ($F_{2,27} = 6,3413$; $p = 0,0055$; Figura 61C) porém as proles SPL3 apresentaram maiores valores quando comparadas às SPL6, enquanto as proles CTLE apresentaram valores intermediários, mas não são diferentes dos outros grupos.

Figura 61 – Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes aos Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Sóleo (LPO, NP-SH e atividade da ChE); B: Cargas fatoriais da dimensão Danos Oxidativos (LPO e NP-SH); C: Cargas fatoriais da dimensão Neurotoxicidade (Atividade da ChE) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

Para análise dos Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos (Figura 62A), o primeiro componente foi denominado de Danos Oxidativos (constituído pela LPO e NP-SH; Autovalor = 2,17; Variabilidade = 72,49%) e o segundo componente denominado de Neurotoxicidade (constituído pela atividade da ChE; Autovalor = 0,59; Variabilidade = 19,58%). Foi observada diferença entre os grupos no componente Danos Oxidativos ($F_{2,27} = 39,647$; $p < 0,0001$; Figura 62B), sendo que as proles SPL apresentaram maiores cargas fatoriais quando comparadas às CTLE. Contudo, não houve diferença entre os grupos no componente Neurotoxicidade ($F_{2,27} = 0,68085$; $p = 0,51467$; Figura 62C).

Figura 62 - Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos

Legenda: A: Diagrama de ordenação da análise de componentes principais das variáveis referentes aos Danos Oxidativos e Neurotoxicidade do Músculo Extensor Longo dos Dedos (LPO, NP-SH e atividade da ChE); B: Cargas fatoriais da dimensão Danos Oxidativos (LPO e NP-SH); C: Cargas fatoriais da dimensão Neurotoxicidade (Atividade da ChE) da prole de ratas *Wistar*. CTLE: prole de ratas controle; SPL3: prole de ratas suplementadas com ômega 3 na dose de 4 g/kg; SPL6: prole de ratas suplementadas com ômega 6 na dose de 4 g/kg. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos, significância adotada de 95%.

3.2.7 Análises de Caminhos

As cargas fatoriais (CF) dos dois primeiros componentes de cada uma das PCAs foram utilizadas para a Análise de Caminhos, buscando avaliar a consistência e facilitar a interpretação das relações lineares casuais entre os modelos. O melhor ajuste, ou seja, modelo que atende os pressupostos estatísticos possui melhor consistência e relações lineares mais definidas. Os pressupostos adotados foram o Índice de Ajuste Comparativo (CFI) baseado em distribuição de χ^2 não central e avalia a complexidade do índice; a Raiz Quadrada Média do Erro de Aproximação (RMSEA) ou discrepância por grau de liberdade e avalia a o erro de aproximação da população amostral do índice; Raiz Quadrada Média Residual (SRMR) que representa o valor residual médio derivado do ajuste da matriz de variância e covariância do modelo hipotético para a matriz de variância e covariância dos dados amostrais. Os efeitos foram considerados como positivos quando possuíram relações diretamente proporcionais e negativos quando possuíram relações inversamente proporcionais.

Os modelos Gestação (CFI = 0,902; RMSEA = 0,104; SRMR = 0,123), Desenvolvimento (CFI = 0,816; RMSEA = 0,277; SRMR = 0,154), Características Mesenquimais (CFI = 0,885; RMSEA = 0,213; SRMR = 0,129) e Fibras Glicolíticas (CFI = 1,000; RMSEA = 0,000; SRMR = 0,084), apresentaram valores satisfatórios. Os modelos Características Musculares (CFI = 0,676; RMSEA = 0,604; SRMR = 0,204) e Fibras Oxidativas (CFI = 0,703; RMSEA = 0,268; SRMR = 0,141) não apresentaram valores dos parâmetros com padrão satisfatório, sendo necessários ajustes como retirada de variáveis colineares ou aumento do n amostral. Contudo, independentemente de tal fato, os modelos desenvolvidos foram passíveis de sustentação teórica por parte da literatura específica, explicando adequadamente a relação entre os processos.

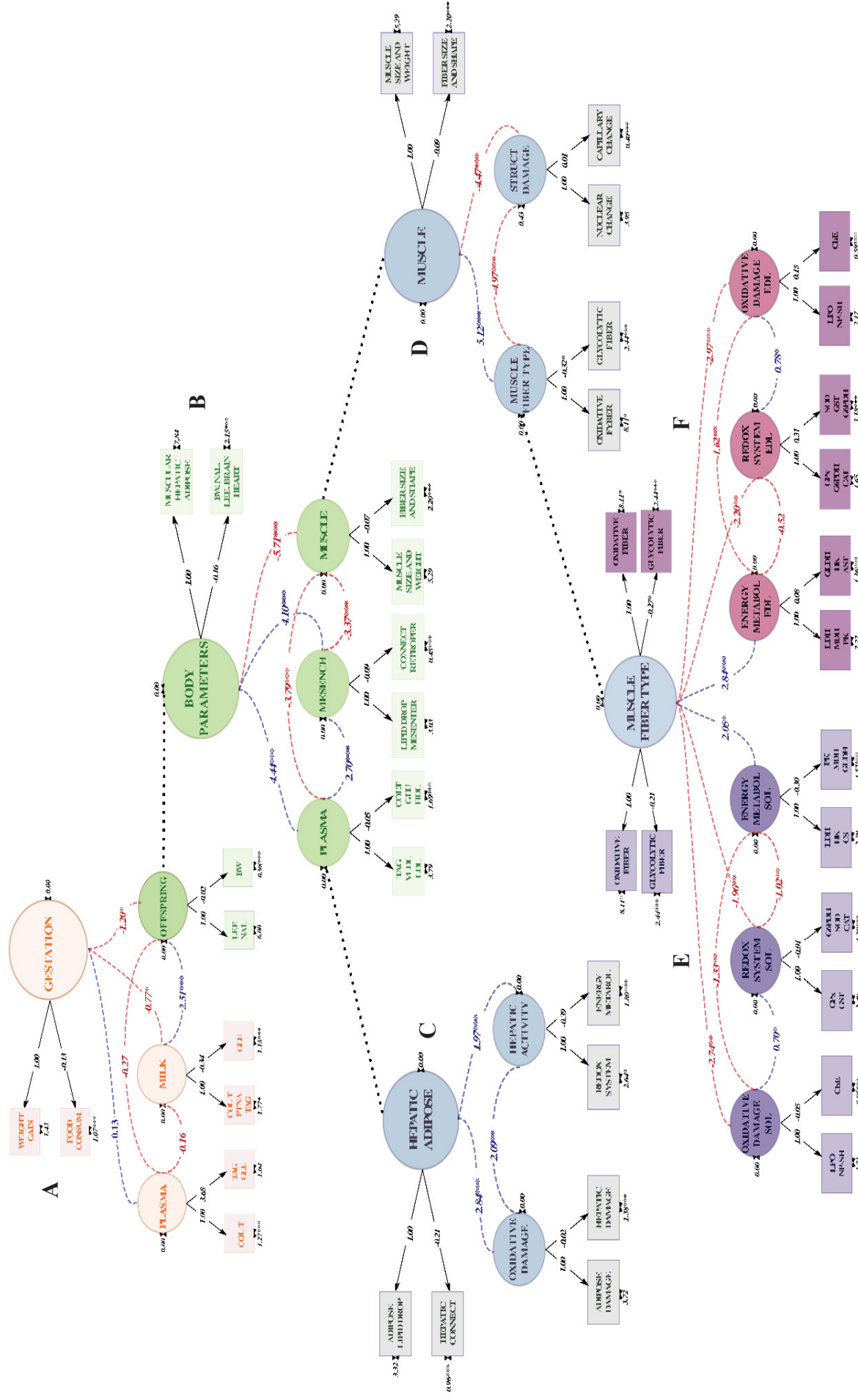
Avaliando as alterações da gestação (Figura 63A), é possível notar efeitos negativos sobre a prole (CF = -1,20; $p = 0,036$) e sobre as características do leite (CF = -0,77; $p = 0,013$). De forma antagonica, as alterações do leite materno exercem efeitos positivos sobre o desenvolvimento (CF = 2,51; $p = 0,001$). Da análise do papel do desenvolvimento da prole, no cenário experimental estabelecido (Figura 63B), é possível notar efeitos da alteração de desenvolvimento sobre o perfil bioquímico plasmáticos (CF = 4,44; $p = 0,001$) e as características mesenquimais (CF = 4,10; $p < 0,001$), enquanto que esta mesma variável exerce efeito negativo sobre as características musculares (CF = -5,71; $p < 0,001$). Da mesma forma, as alterações plasmáticas exercem efeitos positivos sobre as características mesenquimais (CF = 2,70; $p < 0,001$), enquanto influencia negativamente sobre as características musculares (CF = -3,79; $p < 0,001$). É possível identificar também que características mesenquimais (CF = -3,37; $p < 0,001$), reforçam os efeitos negativos sobre o músculo.

Avaliando o efeito das características mesenquimais (Figura 63C) é possível observar efeito positivo dessas alterações sobre o metabolismo hepático (CF = 1,97; $p = 0,02$) e sobre os danos oxidativos do tecido adiposo (CF = 2,84; $p = 0,001$). Da mesma forma, as alterações metabólicas do fígado exercem efeitos positivos sobre a geração de danos oxidativos nos tecidos adiposos (CF = 2,09; $p = 0,02$). Tratando-se dos efeitos das características musculares (Fig. 45D) é possível notar efeito positivo dessas alterações sobre as fibras musculares (CF = 5,12; $p = 0,001$). Contudo, sobre a distribuição capilar e nuclear (CF = -4,47; $p < 0,001$) as características mesenquimais tiveram efeito negativo, efeito que também é reforçado pela alteração das fibras musculares (CF = -4,97; $p < 0,001$).

Ao avaliar as características metabólicas do músculo sóleo (Figura 63E) é possível notar efeito positivo da alteração das fibras sobre o metabolismo do músculo ($CF = 2,05$; $p = 0,011$), contudo, essas mesmas características influenciam de forma negativa o sistema antioxidante ($CF = -1,96$; $p = 0,05$) e o acúmulo de danos oxidativos ($CF = -2,74$; $p = 0,001$). De forma similar, as alterações do metabolismo energético promovem efeitos negativos sobre o sistema antioxidante ($CF = -1,02$; $p = 0,008$) e sobre o acúmulo de danos ($CF = -1,33$; $p = 0,02$). Por fim, as alterações sofridas pelo sistema antioxidante são responsáveis por afetar positivamente o acúmulo de danos oxidativos no músculo sóleo ($CF = 0,70$; $p = 0,027$).

Ao se avaliar as características metabólicas do músculo extensor longo dos dedos (Figura 63F) é possível notar efeito positivo da alteração das fibras sobre o metabolismo do músculo ($CF = 2,84$; $p = 0,002$), contudo, ocorrem influências negativas sobre o sistema antioxidante ($CF = -2,20$; $p = 0,003$) e sobre o acúmulo de danos oxidativos ($CF = -2,97$; $p = 0,001$). De forma similar, as alterações do metabolismo energético promovem efeitos negativos sobre o acúmulo de danos ($CF = -1,62$; $p = 0,001$) e as alterações sofridas pelo sistema antioxidante são responsáveis por afetar positivamente o acúmulo de danos oxidativos no músculo sóleo ($CF = 0,78$; $p = 0,028$).

Visto que tal análise relata apenas as relações lineares entre as variáveis aqui estudadas, discutiremos a seguir os processos metabólicos inerentes a administração excessiva de ômega 3 e ômega 6 durante o período gestacional sobre a prole.



Legenda: A: Gestação, modelo composto pelas PCAs Parâmetros Corporais da Gestação, Parâmetros Corporais ao Desmame, Parâmetros Séricos Plasmáticos, Parâmetros Séricos do Leite e Parâmetros de Desenvolvimento da Prole. B: Desenvolvimento, modelo composto pelas PCAs Parâmetros de Desenvolvimento da Prole, Parâmetros Corporais, Parâmetros Séricos Plasmáticos, Características Mesenquimais e Características Musculares. C: Características Mesenquimais, modelo composto pelas PCAs Características Mesenquimais, Atividade Bioquímica Hepática e Danos Oxidativos Hepáticos e Adiposos. D: Características Musculares, modelo composto pelas PCAs Características Musculares, Caracterização do Tipo de Fibras e Distribuição Capilar e Nuclear. E e F modelos compostos pelas PCAs Características Musculares, Metabolismo Energético, Sistema Antioxidante e Danos Oxidativos e Neurotoxicidade dos respectivos músculos sóleo e extensor longo dos dedos. Linhas pontilhadas em azul simbolizam carga fatorial positiva, linhas pontilhadas em vermelho simbolizam carga fatorial negativa, linhas pontilhadas em preto simbolizam o agrupamento artificial dos modelos. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, significância adotada de 95%.

5.0 DISCUSSÃO

A análise dos resultados compilados no presente estudo permitiu identificar que os efeitos da utilização de AGPIs da família ω -3 podem se apresentar de forma antagônica dependendo da concentração de AGPIs empregada. Apesar dos diversos benefícios promovidos pelo consumo de AGPIs da família ω -3 descritos na literatura, quando as ingestões se dão em excesso os efeitos podem ser bastante distintos. O emprego destes AGPI durante a fase de desenvolvimento tem sido relacionado como causa de alterações no padrão de desenvolvimento, modificações estruturais no tecido muscular, alterações metabólicas e antioxidantes tão relevantes quanto àquelas encontradas quando da ingestão de AGPIs ω -6. Dentre os principais efeitos negativos encontrados estão o sobrepeso, estabelecimento de dislipidemia, alteração do padrão metabólico hepático e muscular, hiperativação do sistema antioxidante e acúmulo de dano oxidativo na prole, além da redução na capacidade oxidativa do músculo esquelético. Na literatura, vários autores tem relacionado o estabelecimento de condições patológicas a partir de mudanças no perfil nutricional de populações e modelos animais. Essas mudanças são descritas comumente em modelos submetidos ao excesso de ácidos graxos saturados (ESTADELLA *et al.*, 2013; MEEY; BLAAK; VAN LOON, 2019) ou em condições onde há significativa alteração da razão ω -6: ω -3 (SHRESTHA *et al.*, 2020b; SIMOPOULOS, 2002, 2016; SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016), portanto torna-se importante entender os efeitos deletérios desses excessos de AGPIs durante o desenvolvimento, especialmente em decorrência do constante estímulo para o consumo de AGPI ω -3 durante a gestação.

A suplementação em excesso com AGPIs ω -3 e ω -6 não foi capaz de promover aumento no ganho de peso e consumo alimentar durante a gestação, mas alterou de maneira pujante a composição corporal das fêmeas. O aumento dos depósitos adiposos nas progenitoras SPL pode estar relacionado com o início de um quadro de obesidade, sendo portanto um fator que contribui fortemente para as alterações encontradas nas proles (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; DU *et al.*, 2010; SHRESTHA *et al.*, 2020a). A alteração do equilíbrio lipídico durante a gestação compreende fator importante para o estabelecimento de obesidade na prole, redução do desenvolvimento muscular e aumento da predisposição à resistência à insulina (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; PRATS-PUIG *et al.*, 2020; TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016).

O excesso desses substratos metabólicos lipídicos é responsável por causar distúrbios no transporte placentário, promovendo aumento do processo inflamatório, redução da síntese de proteínas mitocondriais e prejudicando a capacidade oxidativa placentária e do feto (EASTON; REGNAULT, 2020). Essa associação de eventos é responsável por promover o aumento da expressão e translocação de transportadores lipídicos para a membrana fetoplacentária, promovendo portanto aumento da captação dessas moléculas para os fetos em desenvolvimento (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; MCCURDY *et al.*, 2009; WESOLOWSKI *et al.*, 2018). Este cenário provoca o aumento da mortalidade dos neonatos e do número de natimortos, em decorrência do efeito lipotóxico estabelecido pelo excesso da transferência lipídica através da placenta. Esse quadro pode também estar associado a má formações e/ou alterações funcionais hepáticas e renais estabelecidas durante a exposição embrionária a estes macronutrientes (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018b; CHURCH *et al.*, 2010; HERRERA; DESOYE, 2016).

Nossos achados no entanto, demonstram que, apesar da exposição à altas doses de AGPIs, as progenitoras SPL3 apresentaram resultados plasmáticos similares aos descritos na literatura, reduzindo as concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis totais (BURDGE; CALDER, 2015). A redução das concentrações de triacilgliceróis pode estar relacionada com o aumento da transferência dessas moléculas para o feto durante a gestação e após o parto pela destinação das fontes lipídicas para a produção de leite (RAMÍREZ; LLOBERA; HERRERA, 1983; SHRESTHA *et al.*, 2020a). O aumento das concentrações lipídica e proteica encontrada no leite das progenitoras SPL teve um papel importante no estabelecimento das alterações de desenvolvimento pós-natal da prole. A característica hiperlipídica do leite materno, atua diretamente sobre a diferenciação dos tecidos fetais, levando ao aumento da deposição de tecido adiposo e redução do desenvolvimento muscular dos filhotes (GOMES *et al.*, 2018; MCCURDY *et al.*, 2016; SHRESTHA *et al.*, 2020b).

Além da alteração estrutural, o aumento da disponibilidade de nutrientes durante a gestação e o aleitamento promovem modificações no perfil lipídico plasmático da prole, principalmente aumentando os níveis de colesterol e triacilgliceróis (BARBOUR; HERNANDEZ, 2018a; BUTRUILLE *et al.*, 2019; HUE-BEAUVAIS *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2019). A manutenção desses padrões até a fase adulta reforça o efeito de reprogramação metabólica sobre a prole. O aumento dos depósitos adiposos e

manutenção das dislipidemias plasmáticas estão diretamente relacionados e exercem efeito negativo sobre o tecido muscular, da mesma forma que interferem no processo de desenvolvimento, (DU *et al.*, 2010; LIPINA; HUNDAL, 2017; MCCURDY *et al.*, 2016; PRATS-PUIG *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2009).

A literatura tem demonstrado que em mães obesas o aumento nas concentrações plasmáticas de triacilgliceróis está diretamente relacionado ao aumento do tecido adiposo materno e fetal. Além disso, está relacionado à alterações no padrão de expressão gênica de diversas proteínas musculares, podendo ser afetados tanto genes estruturais, funcionais e metabólicos, reforçando que excesso lipídico provoca efeito negativo do para o correto desenvolvimento e função muscular (PRATS-PUIG *et al.*, 2020). Uma forma de comprovar a associação das dislipidemias e mobilização plasmática de lipídios com o aumento dos depósitos adiposos, é dado pelo aumento da atividade da colinesterase no tecido adiposo retroperitoneal. É relatado na literatura que o aumento das colinesterases está associado a facilitação de processos inflamatórios, secreção de citocinas e aumento da circulação de triacilgliceróis (CHEN *et al.*, 2016; FATHI HAMOUDA *et al.*, 2019).

Devido a esse quadro inflamatório e dislipidêmico, ocorrem alterações metabólicas hepáticas importantes nesses animais (PAYOLLA *et al.*, 2016). Nossos achados permitem observar que nas proles SPL ocorreram modificações do metabolismo energético hepático, sendo que cada AGPI foi capaz de induzir alterações metabólicas diferentes. Os animais SPL3 apresentaram redução da atividade da PK, que leva a redução dos níveis de piruvato celular. Associada a essa redução e o aumento do lactato plasmático, ocorre a redução da atividade da LDH, o que provoca elevação no consumo de piruvato e produção de lactato, podendo estar relacionado com um aumento das vias oxidativas. De forma contrária nas proles SPL6, mesmo com a redução da PK e aumento do lactato plasmático, houve ativação da LDH. Esse aumento da atividade da LDH pode ser justificado pelo desequilíbrio da razão $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ em animais SPL6, devido à reciclagem de NP-SH identificada nesses animais. O importante papel da atividade oposta da LDH no equilíbrio da razão $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ tem sido descrito na literatura como uma forma de minimização dos danos oxidativos e otimização da atividade das enzimas do sistema antioxidante (KAPLAN; GOODFRIEND, 1964; MORGENSTERN *et al.*, 1965; WEBER, 1963; WRÓBLEWSKI; GREGORY, 1961).

As alterações metabólicas promovidas pelo excesso de lipídios são uma fonte importante de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) em excesso e, consequentemente, respondem pelo acúmulo de danos celulares (DLUDLA *et al.*, 2019; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2019). A hiperativação do sistema antioxidante hepático encontrado no presente estudo, é o primeiro mecanismo celular ativado para compensar o aumento da geração de EROS. Embora haja efeitos semelhantes nas proles SPL, como a hiperativação da GPx e redução da concentração de NP-SH, os animais SPL6 apresentaram maior atividade CAT, reforçando o efeito pró-oxidativo desse AGPI (RENAUD *et al.*, 2014; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2019). No entanto, o aumento da atividade da GST reforça a existência de sobrecarga e a redução da eficiência do sistema antioxidante, uma vez que o excesso de AGPIs foi suficiente para a geração de danos à membrana em ambas as proles (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014; HABIG; PABST; JAKOBY, 1976; LEUTNER; ECKERT; MÜLLER, 2001).

Mesmo frente à hiperativação do sistema antioxidante, a resposta não foi suficiente para o consumo de todas as EROS geradas pelo desequilíbrio metabólico, promovendo assim acúmulo de danos oxidativos nos tecidos corporais (DE ANDRADE *et al.*, 2021; MASSCHELIN *et al.*, 2020; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2019). No presente estudo, foi possível observar em ambos os grupos suplementados, os AGPIs promoveram aumento de danos lipídicos (LPO) nos depósitos adiposos retroperitoneal e mesentérico, além do aumento da atividade da ALP hepática (DOMÍNGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2016). Ainda, as proles SPL6 apresentaram maior acúmulo de peroxidação lipídica hepática reforçando o efeito pró-oxidante do excesso de ω -6 (WIKTOROWSKA-OWCZAREK; BEREZINSKA; NOWAK, 2015).

Durante o desenvolvimento, a diferenciação de células mesenquimais se vale da mesma via de sinalização intracelular para originar adipócitos ou células musculares. Devido à característica competitiva da adipogênese e da miogênese (DU SERT *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2009), o aumento dos depósitos adiposos pode estar diretamente relacionado com a redução do tamanho muscular encontrado nas proles SPL. Outra possibilidade para justificar o aumento identificado no peso dos músculos dos animais SPL, pode residir no fato que determinados genes relacionados à diferenciação de adipócitos também se relacionam ao aumento de síntese de matriz extracelular muscular

e ao aumento da deposição lipídica intramuscular (CORNACHIONE *et al.*, 2013; TANG; LANE, 2012; YAN *et al.*, 2013). Os genes relacionados com a adipogênese também influenciam na diferenciação de fibras glicolíticas, o que também pode estar relacionado com o aumento do peso muscular nos animais SPL (KITAMURA *et al.*, 2007; SCHIAFFINO *et al.*, 2013; SHAHJAHAN, 2015; VON MALTZAHN *et al.*, 2012).

Além das alterações de tamanho, peso e composição das fibras musculares, os animais SPL apresentaram alteração no padrão de distribuição nuclear e capilarização. De forma contrária ao que tem sido descrito em quadros de obesidade e de aumento de fibras glicolíticas, os animais apresentaram aumento do número de capilares e aumento do número e tamanho dos núcleos (BRUN *et al.*, 2017; KANEGUCHI *et al.*, 2014; RATTIGAN *et al.*, 2007; ROSS *et al.*, 2018). No entanto, o aumento do número de núcleos periféricos e centrais e por consequência a redução do domínio mionuclear, é uma das principais características morfológicas associadas ao dano muscular (CUTLER *et al.*, 2018; SCHIAFFINO *et al.*, 2013; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011; WOSCZYNA; RANDO, 2018). Da mesma forma, o aumento da capilarização está associado ao processo inicial de regeneração muscular, sendo fundamental para a ativação das células satélites e recrutamento de células inflamatórias (BRUN *et al.*, 2017; HAVIXBECK *et al.*, 2016; JOANISSE *et al.*, 2016; RIGAMONTI *et al.*, 2014). Sendo assim, pode-se associar o acúmulo de lipídios intramusculares a essas características dos animais SPL (PARK; SEO, 2020; TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016).

Analizando a resposta bioquímica dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos, foi possível identificar diferença no metabolismo energético, sistema antioxidante e no acúmulo de danos oxidativos relacionada com a característica de fibra de cada músculo. Músculos com predominância de fibras oxidativas, como o sóleo (ARMSTRONG, 1984; EDDINGER; MOSS; CASSENS, 1985), possuem maior resistência aos efeitos lipotóxico do acúmulo de gotículas lipídicas intracelulares (PARK; SEO, 2020), quando comparados a músculos com predominância de fibras glicolíticas, como o extensor longo dos dedos (ARMSTRONG, 1984; EDDINGER; MOSS; CASSENS, 1985). Além disso, houve redução na atividade das enzimas de metabolismo de carboidratos em ambos os músculos, reforçando o efeito lipotóxico sugerido sobre a atividade metabólica muscular.

O acúmulo de lipídios intracelulares é um fator importante na geração de diaciglicerol e ceramidas, que atuam diretamente sobre a atividade mitocondrial e

interferem no equilíbrio metabólico da fibra muscular (LAI *et al.*, 2020; MCCURDY *et al.*, 2016; TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016). O aumento da disponibilidade lipídica e de metabólitos lipídicos intermediários, estimula a β -oxidação e reduz os níveis da glicólise (BOSMA, 2016). Inicialmente, o consumo lipídico promove redução na atividade das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), principalmente da citrato sintase, promovendo acúmulo de acetil-CoA (MCCURDY *et al.*, 2016). Dessa forma, ocorre a inativação sequencial das demais enzimas do metabolismo de carboidratos, promovendo acúmulo de glicose e glicogênio muscular (JANA *et al.*, 2019).

A redução da atividade do metabolismo de carboidratos reduz a transcrição e translocação de transportadores de glicose sensíveis à insulina (GLUT4), promovendo com o passar do tempo, resistência muscular à insulina (MEEX; BLAAK; VAN LOON, 2019; TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016). Também relacionado a esse processo, ocorre redução da formação de mitocôndrias, redução da expressão de proteínas mitocondriais e redução da produção de energia pela célula (JANA *et al.*, 2019; PARK; SEO, 2020). Dessa forma, a redução da atividade das enzimas de metabolismo energético encontradas nos animais SPL, associadas ao acúmulo de lipídios intracelulares, pode sugerir que este cenário com aporte excessivo de lipídios esteja relacionado ao desencadeamento de um processo de resistência à insulina nesses animais.

No tecido muscular, a redução da atividade mitocondrial e das enzimas do metabolismo de carboidratos, são fatores importantes para a indução da plasticidade das fibras musculares. Devidas essas características, ocorre indução de adaptação principalmente de fibras oxidativas, o que acaba promovendo aumento de fibras glicolíticas (ECKARDT; TAUBE; ECKEL, 2011). O processo de alteração fenotípica das fibras musculares é iniciado pela sinalização e ativação de células satélites, que migram para o interior da fibra alterando sua estrutura e/ou formam novas fibras musculares (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013; HOPPELER, 2016). Devida a característica metabólica instalada no tecido e no organismo, ocorre a ativação de genes promotores de diferenciação de fibras glicolíticas, como os da família FOXO (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013; KITAMURA *et al.*, 2007; TONG *et al.*, 2009). Essas alterações associadas ao aumento de núcleo e da proporção de fibras IIB encontradas nas proles SPL reforçam o efeito lipotóxico sobre o músculo desses animais.

Além da característica pró-oxidante da β -oxidação e diminuição da geração de ATP, as alterações mitocondriais exigem maior atividade da cadeia transportadora de elétrons, promovendo maior geração de EROS (JANA *et al.*, 2019; PARK; SEO, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2020b). Da mesma forma que no fígado, a hiperativação do sistema antioxidante encontrada nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos são formas de a célula compensar o aumento da geração de EROS. Embora haja efeitos semelhantes nos dois músculos, como a hiperativação da GPx e GST, o musculo extensor longo dos dedos apresentou também redução da atividade da G6PDH, reforçando sua maior susceptibilidade ao estresse oxidativo devido ao predomínio de fibras glicolíticas (CARTER; JUSTICE; THOMPSON, 2019).

Outra característica importante encontrada nos animais SPL é o aumento da concentração de NP-SH, sendo que o tiol mais abundante nas células é a glutatona reduzida (GSH) (GRIFFITH, 1999). O aumento da concentração desses NP-SH normalmente está associado com a redução do seu consumo, no entanto houve aumento da atividade da GPx e GST em ambos os músculos, frente a ambas as suplementações. O aumento da síntese de NP-SH pode estar relacionado com a característica pró-oxidativa estabelecida durante o período gestacional (DENNERY, 2007), como resposta à constante perturbação do sistema antioxidante (BALDELLI *et al.*, 2019) e com a alteração nutricional das progenitoras e das proles (GOULD; PAZDRO, 2019), podendo inclusive ser indicativo de dano celular e indução de processos inflamatórios e degenerativos. Mesmo com aumento da concentração de NP-SH, com a hiperativação da GPx e da GST, houve sobrecarga e redução da eficiência do sistema antioxidante, podendo ser um indicativo de que houve excesso de EROS, as quais foram suficiente para promover o aumento da peroxidação lipídica em ambos os músculos e proles (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014; HABIG; PABST; JAKOBY, 1976; LEUTNER; ECKERT; MÜLLER, 2001). Associados as alterações metabólicas, o desbalanço do sistema antioxidante e acúmulo de danos oxidativos podem ser os principais fatores promotores das alterações estruturais encontradas nos músculos das proles SPL (CARTER; JUSTICE; THOMPSON, 2019; FERREIRA; REID, 2008; MENG; YU, 2010).

De forma semelhante também a comunicação neuromuscular é afetada pelo excesso de lipídios, onde ocorre redução da atividade da ChE nos cenários onde ocorrem dietas hiperlipídicas (CARTER; JUSTICE; THOMPSON, 2019; EL KHAYAT EL

SABBOURI *et al.*, 2020). Devida a baixa capacidade adaptativa de músculos com predominância de fibras glicolíticas ao estresse metabólico, oxidativo e lipotóxico, as alterações promovidas por esses desbalanços afetaram expressivamente o músculo extensor longo dos dedos das proles SPL (LIU *et al.*, 2017; MARTYN; FAGERLUND; ERIKSSON, 2009; MENG; YU, 2010). No entanto, em junções neuromusculares de músculos com predominância de fibras oxidativas, como o músculo sóleo, o excesso de lipídios é responsável pelo efeito neurotóxico que deflagra transição metabólica e estrutural no compartimento pós sináptico (SCHIAFFINO; SANDRI; MURGIA, 2007; TINTIGNAC; BRENNER; RÜEGG, 2015). A lipotoxicidade induz adaptação das estruturas juncionais, reduzindo as junções rápidas e aumentando as junções lentas, dessa forma prejudicando a estrutura comunicativa muscular e sua responsividade (LEE, 2019). Sendo assim, o aumento da atividade da ChE no músculo sóleo das proles SPL pode estar relacionado com a plasticidade juncional e muscular desencadeada pelo excesso de lipídios intramusculares (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013; SCHIAFFINO; SANDRI; MURGIA, 2007; TINTIGNAC; BRENNER; RÜEGG, 2015).

Portanto, os resultados compilados sugerem que as doses de AGPIs utilizadas durante o período gestacional foram capazes de promover modificações na prole, reforçando a sugestão de efeito de programação metabólica. É importante observar que independente dos efeitos benéficos de ω -3 em diferentes condições patológicas, o excesso destes AGPIs durante o desenvolvimento embrionário promove alterações semelhantes àquelas produzidas pelo excesso de ω -6 e, desta forma, ocasionam alterações no equilíbrio lipídico, desenvolvimento mesenquimal e muscular, metabolismo energético e sistema antioxidante hepático e muscular, além de promover acúmulo de danos oxidativos e estruturais.

6.0 CONCLUSÃO

A dose excessiva de AGPIs administradas durante a gestação e lactação promoveu alterações similares nas proles de ratas *Wistar*, sendo que interferiu diretamente no desenvolvimento mesenquimal e muscular desses animais, além de alterar significativamente o metabolismo e sistema antioxidante hepático e muscular, promover acúmulo de danos oxidativos e estruturais. Dessa forma, é importante ressaltar que independente do efeito benéfico, em excesso o ômega 3 durante o desenvolvimento embrionário é tão prejudicial quando o excesso do ômega 6, ambos promovendo alterações metabólicas e estruturais similares às encontradas em quadros de obesidade e de início de resistência à insulina.

REFERÊNCIAS

- AEBI, Hugo. Catalase in Vitro. **Methods in Enzimology**, [s. l.], v. 105, p. 121–126, 1985.
- AHN, Bumsoo *et al.* Mitochondrial oxidative stress impairs contractile function but paradoxically increases muscle mass via fibre branching. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 411–428, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12375>
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ANDREWS, P.; JOHNSON, R. J. Evolutionary basis for the human diet: consequences for human health. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 287, n. 3, p. 226–237, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/joim.13011>
- ANDRIKOU, Carmen; ARNONE, Maria Ina. Too many ways to make a muscle: Evolution of GRNs governing myogenesis. **Zoologischer Anzeiger**, [s. l.], v. 256, p. 2–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.03.005>
- ARMSTRONG, R. B. Muscle Fiber Type Composition of the Rat Hindlimb. [s. l.], v. 272, p. 259–272, 1984.
- BALDELLI, Sara *et al.* Glutathione and nitric oxide: Key team players in use and disuse of skeletal muscle. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1–18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11102318>
- BALDWIN, J. *et al.* Energy metabolism in the tropical abalone *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s. l.], v. 342, p. 213–225, 2007.
- BARBOUR, Linda A.; HERNANDEZ, Teri L. Maternal Lipids and Fetal Overgrowth: Making Fat from Fat. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 1638–1647, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.08.007>
- BARBOUR, Linda A.; HERNANDEZ, Teri L. Maternal Non-glycemic Contributors to Fetal Growth in Obesity and Gestational Diabetes: Spotlight on Lipids. **Current Diabetes Reports**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1008-2>
- BIANCONI, Santiago *et al.* Effects of dietary omega-3 PUFAs on growth and development: Somatic, neurobiological and reproductive functions in a murine model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 61, p. 82–90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.007>
- BIDIGARE, R.R.; FREDERIC, D.; KING, F.D. The measurement of glutamate dehydrogenase activity in prawns *Penaeus monodon* and its role in the regulation of ammonium excretion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 70, n. B, p. 409–413, 1981.
- BIOBAKU, Fatima *et al.* Macronutrient-Mediated Inflammation and Oxidative Stress: Relevance to Insulin Resistance, Obesity, and Atherogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 104, n. 12, p. 6118–6128, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01833>

BLAAUW, Bert; SCHIAFFINO, Stefano; REGGIANI, Carlo. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1645–1687, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>

BOSMA, Madeleen. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 340, n. 2, p. 180–186, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.023>

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

BRION, Marie Jo A. *et al.* Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: Exploring parental comparisons and prenatal effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 91, n. 3, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28623>

BROOKE, M H; KAISER, K K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Archives of neurology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 369–379, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480280083010>

BRUN, Caroline E *et al.* **The Satellite Cell Niche in Skeletal Muscle**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00010-X>

BUCKINGHAM, Margaret *et al.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 202, p. 59–68, 2003.

BUCKINGHAM, Margaret; RIGBY, Peter W.J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 225–238, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>

BURDGE, Graham C.; CALDER, Philip C. Introduction to fatty acids and lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, [s. l.], v. 112, p. 1–16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000365423>

BURTON, Patrick Michael. Insights from Diploblasts; The Evolution of Mesoderm and Muscle. **Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 310, n. B, p. 5–14, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.b>

BUTRUILLE, Laura *et al.* Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 2381–2393, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z>

CABEÇO, Ludimila Canuto *et al.* Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and myogenin expression in offspring. **Journal of Molecular Histology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 461–471, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10735-012-9413-3>

CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>

CAMPODONICO-BURNETT, William *et al.* Maternal obesity and western-style diet impair fetal and juvenile offspring skeletal muscle insulin-stimulated glucose transport

in nonhuman primates. **Diabetes**, [s. l.], v. 69, n. 7, p. 1389–1400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db19-1218>

CARTER, Christy S.; JUSTICE, Jamie N.; THOMPSON, La Dora. Lipotoxicity, aging, and muscle contractility: does fiber type matter? **GeroScience**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 297–308, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00077-z>

CASTRO, L. Filipe C.; TOCHER, Douglas R.; MONROIG, Oscar. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 62, p. 25–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001>

CHEN, Vicky Ping *et al.* Butyrylcholinesterase deficiency promotes adipose tissue growth and hepatic lipid accumulation in male mice on high-fat diet. **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 8, p. 3086–3095, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2016-1166>

CHILDRESS, J.J.; SOMERO, G.N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979.

CHRISTI, William W.; HARWOO, John L. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 401–421, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/EBC20190082>

CHURCH, M W *et al.* Neurotoxicology and Teratology Excess omega-3 fatty acid consumption by mothers during pregnancy and lactation caused shorter life span and abnormal ABRs in old adult offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 171–181, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.09.006>

CIARDIELLO, M.A. *et al.* L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus* Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], p. 11–23, 2000.

CIARDIELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1250, p. 79–82, 1995.

CICHOZ-LACH, Halina; MICHALAK, Agata. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 25, p. 8082–8091, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>

CONFORTIM, Heloisa Deola *et al.* MATERNAL PROTEIN RESTRICTION DURING PREGNANCY AND LACTATION AFFECTS THE DEVELOPMENT OF MUSCLE FIBERS AND NEUROMUSCULAR JUNCTIONS IN RATS. **Muscle & Nerve**, [s. l.], n. January, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mus.25187>

CORNACHIONE, Anabelle S *et al.* Effects of 40 min of maintained stretch on the soleus and plantaris muscles of rats applied for different periods of time after hindlimb immobilization. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 115, p. 505–511, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.11.008>

CRITTENDEN, Alyssa N.; SCHNORR, Stephanie L. Current views on hunter-gatherer nutrition and the evolution of the human diet. **American Journal of Physical**

Anthropology, [s. l.], v. 162, n. November 2016, p. 84–109, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajpa.23148>

CROS, N *et al.* Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 276, n. 2 Pt 2, p. R308-16, 1999.

CROUCH, R. K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>

CURRIE, Peter D; INGHAM, P W. Induction and Patterning of Embryonic Skeletal Muscle Cells in the Zebrafish. *In*: **MUSCLE DEVELOPMENT AND GROWTH**. [S. l.: s. n.], 2001. p. 1–17.

CUTLER, Alicia A. *et al.* Non-equivalence of nuclear import among nuclei in multinucleated skeletal muscle cells. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 131, n. 3, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.207670>

DAL PAI-SILVA, Maeli; CARVALHO, Robson Francisco. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 36, p. 21–31, 2007.

DÂNGELO, José Geraldo; FATTINI, Carlo Américo. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

DE ANDRADE, Bárbara Zanardini *et al.* Whole-body vibration promotes lipid mobilization in hypothalamic obesity rat. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 68, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101456>

DE CARVALHO, Carla C.C.R.; CARAMUJO, Maria José. The various roles of fatty acids. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>

DENNERY, Phyllis A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 155–162, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>

DERNINI, Sandro; BERRY, Elliot M. Mediterranean Diet: From a Healthy Diet to a Sustainable Dietary Pattern. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 2, n. 15, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00015>

DLUDLA, Phiwayinkosi V. *et al.* Inflammation and oxidative stress in an obese state and the protective effects of gallic acid. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11010023>

DOMÍNGUEZ-PÉREZ, Mayra *et al.* Hepatocyte growth factor reduces free cholesterol-mediated lipotoxicity in primary hepatocytes by countering oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7960386>

DU, Min *et al.* **Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development**. [S. l.: s. n.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077099>

DU SERT, Nathalie Percie *et al.* The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for

reporting animal research. **PLoS Biology**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

DUBOWITZ, V; BROOKE, M. **Muscle biopsy: a mordern approach**. 1. ed. London: Saunders College Publishing, 1973.

DUNLAP, Steven; HEINRICHS, Stephen C. Neuronal depletion of omega-3 fatty acids induces flax seed dietary self-selection in the rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 1250, p. 113–119, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.072>

EASTON, Zachary J.W.; REGNAULT, Timothy R.H. The impact of maternal body composition and dietary fat consumption upon placental lipid processing and offspring metabolic health. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12103031>

ECKARDT, Kristin; TAUBE, Annika; ECKEL, Juergen. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: Role of lipid accumulation and physical inactivity. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 163–172, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9168-2>

EDDINGER, T. J.; MOSS, R. L.; CASSENS, R. G. Fiber number and type composition in extensor digitorum longus, soleus, and diaphragm muscles with aging in Fischer 344 rats. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1033–1041, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/33.10.2931475>

EL KHAYAT EL SABBOURI, Hiba *et al.* Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats? **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 140, p. 111322, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111322>

ELLMANN, G.L. *et al.* New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 7, p. 88–95, 1961.

ENGEL, Andrew; FRANZINI-ARMSTRONG, Clara. **Myology: Basic and Clinical**. 2. ed. Michigan: McGraw-Hill, 1994.

ESTADELLA, Débora *et al.* Lipotoxicity: Effects of dietary saturated and transfatty acids. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/137579>

FATHI HAMOUDA, Asmaa *et al.* Study the Relation Between Acetylcholinesterase and Obesity in University Students. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20190803.11>

FERREIRA, Leonardo F.; REID, Michael B. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 853–860, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00953.2007>

FONTELLA, Fernanda U. *et al.* Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 105–111, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-004-9691-6>

FRANKENBERG, Stephen R. *et al.* The mammalian blastocyst. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 210–232, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wdev.220>

- FRIEDEWALD, William T; LEVY, R I; FREDRICKSON, D S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- FRISCHKNECHT, R.; BELVERSTONE, D.; VRBOVÁ, G. The response of adult and developing rat plantaris muscle to overload. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 431, n. 2, p. 204–211, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00410192>
- GALDINO, Alana Marielle Rodrigues. **Plasticidade do desenvolvimento muscular e da expressão temporal de fatores reguladores miogênicos durante os estádios iniciais de Rhamdia quelen incubados em diferentes temperaturas**. 101 f. 2013. - Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2013.
- GAO, Yingxin *et al.* Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 465–469, 2008a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.09.021>
- GAO, Yingxin *et al.* Micromechanical modeling of the epimysium of the skeletal muscles. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 1–10, 2008b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.08.008>
- GEPSTEIN, Vardit; WEISS, Ram. Obesity as the Main Risk Factor for Metabolic Syndrome in Children. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, n. August, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00568>
- GILLIES, Allison R.; LIEBER, Richard L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & Nerve**, [s. l.], v. 44, n. September, p. 318–331, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mus.22094>
- GLADYSHEV, M. I. *et al.* Efficiency of transfer of essential polyunsaturated fatty acids along trophic chains in aquatic ecosystems. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 426, n. 1, p. 158–160, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1607672909030089>
- GOMES, Rodrigo Mello *et al.* Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 61, p. 24–32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.006>
- GOSS, Charles Mayo. **Gray Anatomia**. 29. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988.
- GOULD, Rebecca L.; PAZDRO, Robert. Impact of supplementary amino acids, micronutrients, and overall diet on glutathione homeostasis. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11051056>
- GRIFFITH, Owen W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 9–10, p. 922–935, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8)
- GUILLOU, Hervé *et al.* The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 186–199, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>

GUIMARÃES, Flávio de Rezende *et al.* Aspectos Anatômicos Dos Músculos Estriados Esqueléticos. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 264–275, 2015.

GUYTON, Arthur C; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011.

HABIG, H; PABST, J; JAKOBY, B. Glutathione S-Transferase AA from Rat Liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 175, p. 710–716, 1976.

HAILE, Belay; NEME, Kumera; BELACHEW, Tefera. Evolution of human diet and effect of globalization on regional diet with emphasis to the Mediterranean diet. **Nutrition & Food Science**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 869–883, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1108/NFS-02-2017-0017>

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HAMALAINEN, Nina; PETTE, Dirk. The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, IID and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat and Rabbit. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 733–743, 1993.

HARIHARAN, Divya; VELLANKI, Kavitha; KRAMER, Holly. The Western Diet and Chronic Kidney Disease. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 17, n. 16, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0529-6>

HAVIXBECK, J. J. *et al.* Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 241–252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0215-064R>

HAWKE, Thomas J.; GARRY, Daniel J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 91, n. J Appl Physiol, p. 534–551, 2001.

HEMBERGER, Myriam; HANNA, Courtney W.; DEAN, Wendy. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 27–43, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0169-4>

HERRERA, Emilio; DESOYE, Gernot. Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic conditions. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 109–127, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0025>

HICKMAN, Cleveland P; ROBERTS, Larry S; LARSON, Allan. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2016.

HILDEBRAND, Milton; GOSLOW, George. **Análise das Estruturas dos Vertebrados**. 2. ed. [S. l.]: Editora Atheneu, 2006.

HIXSON, Stefanie M.; ARTS, Michael T. Climate warming is predicted to reduce omega-3, long-chain, polyunsaturated fatty acid production in phytoplankton. **Global change biology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 2744–2755, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gcb.13295>

HOLLWAY, Georgina; CURRIE, Peter. Vertebrate myotome development. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 172–179, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/bdrc.20046>

HOLLWAY, Georgina E.; CURRIE, Peter D. Myotome meanderings. Cellular morphogenesis and the making of muscle. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 855–860, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor920>

HOOVER, S. L.; THUMA, Jeffrey B. Invertebrate Muscles: Muscle Specific Genes and Proteins. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 1001–1060, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2004>

HOPPELER, Hans. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 219, n. 2, p. 205–213, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.128207>

HUE-BEAUVAIS, C. *et al.* Diet-induced modifications to milk composition have long-term effects on offspring growth in rabbits. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 761–770, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas2016.0847>

JACKMAN, R W; KANDARIAN, S C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, [s. l.], v. 287, n. 4, p. C834–843, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>

JANA, Baishali Alok *et al.* Cytosolic lipid excess-induced mitochondrial dysfunction is the cause or effect of high fat diet-induced skeletal muscle insulin resistance: a molecular insight. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 957–963, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4551-7>

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, [s. l.], v. 26, p. 853–856, 1991.

JOANISSE, Sophie *et al.* Skeletal Muscle Regeneration, Repair and Remodelling in Aging: The Importance of Muscle Stem Cells and Vascularization. **Gerontology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 91–100, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000450922>

JUNQUEIRA, L C; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2017.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos; COSSERMELLI, W; BRENTANI, R. Differential staining of Collagens Type I, II and III by Sirius Red and Polarization Microscopy. **Arch Histol Jap**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 267–274, 1978.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos; JUNQUEIRA, Luiza Maria. **Técnicas Básicas de Histologia e Citologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KABEYA, Naoki *et al.* Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. **Science Advances**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar6849>

KANEGUCHI, Akinori *et al.* Intermittent whole-body vibration attenuates a reduction in the number of the capillaries in unloaded rat skeletal muscle. **BMC Musculoskeletal Disorders**, [s. l.], v. 15, p. 1–9, 2014.

KAPLAN, Nathan O.; GOODFRIEND, Theodore L. Role of the two types of lactic dehydrogenase. **Advances in Enzyme Regulation**, [s. l.], v. 2, n. C, p. 203–212, 1964. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(64\)80014-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(64)80014-5)

- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 251, p. 6138–6188, 1976.
- KITAMURA, Tadahiro *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 117, n. 9, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI32054>
- KITTO, G Barrie. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. In: **METHODS IN ENZIMOLOGY**. [S. l.]: Elsevier, 1969. p. 106–116. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(69\)13023-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(69)13023-2)
- KLIMCZEWSKA, Katarzyna; KASPERCZUK, Anna; SUWIŃSKA, Aneta. The Regulative Nature of Mammalian Embryos. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 128, p. 105–149, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.010>
- KOMPRDA, Tomáš. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 25–38, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.10.008>
- KOPP, Wolfgang. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [s. l.], v. 12, p. 2221–2236, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>
- KRAUSE NETO, Walter *et al.* Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 8, n. 713, p. 15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1644-4>
- KÜLTZ, Dietmar. Evolution of cellular stress response mechanisms. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 333, n. 6, p. 359–378, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.2347>
- KUNZ, R I *et al.* Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. **Publicatio UEPG: Ciencias Biologicas e da Saude**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 123–129, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5212/Publ.Biologicas.v.19i2.0005>
- KUNZ, Regina Inês *et al.* Morfologia dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar* imobilizados e remobilizados em meio aquático. **Conscientiae Saúde**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 595–602, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5585/ConsSaude.v13n4.5179>
- LAI, Nicola *et al.* Mitochondrial Utilization of Competing Fuels Is Altered in Insulin Resistant Skeletal Muscle of Non-obese Rats (Goto-Kakizaki). **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 11, n. June, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00677>
- LARSSON, Lars *et al.* Effects of Age on Physiological, Immunohistochemical and Biochemical Properties of Fast-Twitch Single Motor Units in the Rat. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 443, p. 257–275, 1991.
- LEACH, E.H. Fat staining with sudan black b. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 47, p.

635–637, 1934.

LEE, Young il. Differences in the constituent fiber types contribute to the intermuscular variation in the timing of the developmental synapse elimination. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45090-6>

LEE, James; KOH, David; ONG, C. N. Statistical evaluation of agreement between two methods for measuring a quantitative variable. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 61–70, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0010-4825\(89\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0010-4825(89)90036-X)

LEIKIN-FRENKEL, Alicia. Is there A Role for Alpha-Linolenic Acid in the Fetal Programming of Health? **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm5040040>

LEONARD, William R.; SNODGRASS, J. Josh; ROBERTSON, Marcia L. Effects of brain evolution on human nutrition and metabolism. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 27, p. 311–327, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093659>

LEUTNER, S.; ECKERT, A.; MÜLLER, W. E. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 108, p. 955–967, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s007020170015>

LIPINA, Christopher; HUNDAL, Harinder S. Lipid modulation of skeletal muscle mass and function. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 190–201, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12144>

LIU, Hua *et al.* The role of oxidative stress in decreased acetylcholinesterase activity at the neuromuscular junction of the diaphragm during sepsis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/9718615>

LONG, Y C *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. **Diabetologia**, [s. l.], v. 48, p. 2354–2364, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1962-5>

LUVESQUE, H.M. *et al.* Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 60, n. 3–4, p. 257–267, 2002.

MACHADO, Angelo. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

MANTOVANI, Carolina Stefano. **Estudo de regiões evolutivamente conservadas e de fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação do gene da miostatina em vertebrados**. 173 f. 2015. - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2015.

MAROCO, João. **Análise de equações estruturais: Fundamentos teóricos, software & aplicações**. [S. l.]: ReportNumber, Lda, 2010.

MAROCO, João; GARCIA-MARQUES, Teresa. Qual a fiabilidade do alfa de Cronbach? Questões antigas e soluções modernas? **Laboratório de Psicologia**, [s. l.], v.

4, n. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.14417/lp.763>

MARTYN, J A J; FAGERLUND, M Jonsson; ERIKSSON, L I. Basic principles of neuromuscular transmission. **Anaesthesia**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 1–9, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2008.05865.x>

MASSARO, Marika *et al.* The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP (H) oxidase and PKC □ inhibition. **Medical Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 41, p. 15184–15189, 2007.

MASSCHELIN, Peter M. *et al.* The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, n. January, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01638>

MASSIERA, Florence *et al.* A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 51, n. 8, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.M006866>

MATSUDA, Morihiro; SHIMOMURA, Iichiro. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>

MAYEUF-LOUCHART, A.; STAELS, B.; DUEZ, H. Skeletal muscle functions around the clock. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], v. 17, n. S1, p. 39–46, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dom.12517>

MCCURDY, Carrie E. *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 323–335, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI32661>

MCCURDY, Carrie E *et al.* Maternal obesity reduces oxidative capacity in fetal skeletal muscle of Japanese macaques. **JCI Ins**, [s. l.], v. 1, n. 16, p. 1–17, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86612>

MCGROSKY, Amanda *et al.* Gross intestinal morphometry and allometry in primates. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 81, n. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajp.23035>

MEEEX, Ruth C.R.; BLAAK, Ellen E.; VAN LOON, Luc J.C. Lipotoxicity plays a key role in the development of both insulin resistance and muscle atrophy in patients with type 2 diabetes. **Obesity Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1205–1217, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/obr.12862>

MENG, Si Jin; YU, Long Jiang. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1509–1526, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms11041509>

MENZEL, Ralph *et al.* Presence or absence? Primary structure, regioselectivity and evolution of Δ^{12}/ω^3 fatty acid desaturases in nematodes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1864, n. 9, p. 1194–1205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.05.001>

MILLS, Daniel B.; CANFIELD, Donald E. Oxygen and animal evolution: Did a rise of atmospheric oxygen “trigger” the origin of animals? **BioEssays**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 1145–1155, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bies.201400101>

MINAMOTO, Viviane Balisardo. Classificação e adaptações das fibras musculares : uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 50–55, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/FPUSP.V12I3.76719>

MØLLER, Ian M.; JENSEN, Poul Erik; HANSSON, Andreas. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 58, p. 459–481, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>

MONROIG, Óscar; KABEYA, Naoki. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. **Fisheries Science**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 911–928, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1254-x>

MORGENSTERN, Stanley *et al.* Automated Determination of of Lactic Dehydrogenase Enzymes . **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 13, p. 149–161, 1965.

NELSON, David L; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISSN 15326500.

NEUPARTH, Maria João Garrett Silveirinha Sottomayor. **Contribuição das células precursoras miogénicas para a plasticidade muscular esquelética no modelo animal**. 149 f. 2005. - Universidade de Aveiro, [s. l.], 2005.

NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0806-8>

OGATA, T. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. **Arch Histol Cytol**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 385–424, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1679/aohc.51.385>

OVALLE, William K; HANIRNEY, Patrick C; NETTER, Frank Henry. **Netter Bases da Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2014.

PAIXÃO, Nathalie Alves da. **Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular**. 93 f. 2016. - Universidad de São Paulo, [s. l.], 2016.

PARK, Sung Sup; SEO, Young Kyo. **Excess accumulation of lipid impairs insulin sensitivity in skeletal muscle**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21061949>

PAYOLLA, Tanyara Baliani *et al.* High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 422, p. 192–202, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.004>

PENG, Xie *et al.* Effects of Fat Supplementation during Gestation on Reproductive Performance, Milk Composition of Sows and Intestinal Development of Their Offspring. **Animals**, [s. l.], v. 9, n. 125, p. 2–11, 2019.

PEREIRA, Raquel Tatiane. **Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético em peixes: técnicas de estudo e análise**. 116 f. 2010. - Universidade Federal de Lavras, [s. l.], 2010.

PETER, James B *et al.* Metabolic Profiles of Three Fiber Types of Skeletal Muscle in Guinea Pigs and Rabbits. **Biochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 14, p. 2627–2633, 1972.

PLUSA, Berenika; PILISZEK, Anna. Common principles of early mammalian embryo self-organisation. **Development**, [s. l.], v. 147, n. 14, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.183079>

PRATS-PUIG, Anna *et al.* DNA Methylation Reorganization of Skeletal Muscle-Specific Genes in Response to Gestational Obesity. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00938>

PUCHTLER, Holde *et al.* Methacarn (methanol-Carnoy) fixation - Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 97–116, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00306176>

PURSLOW, Peter P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 947–966, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00141-1)

PUTMAN, C. T. *et al.* Pyruvate dehydrogenase activity and acetyl group accumulation during exercise after different diets. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 265, n. 5 28-5, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.265.5.e752>

RAMATHAL, Cyril Y. *et al.* Endometrial decidualization: Of mice and men. **Seminars in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 17–26, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242989>

RAMÍREZ, Ignasi; LLOBERA, Miquel; HERRERA, Emilio. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: Effect of postmaturity. **Metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 333–341, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(83\)90040-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(83)90040-9)

RAPOPORT, Stanley I.; RAO, Jagadeesh S.; IGARASHI, Miki. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [s. l.], v. 77, n. 5–6, p. 251–261, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.023>

RATTIGAN, Stephen *et al.* **Obesity, insulin resistance, and capillary recruitment**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10739680701282796>

RENAUD, Helen J. *et al.* Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver-insights into mechanisms of hepatic steatosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088584>

RIDGWAY, Neale D.; MCLEOD, Roger S. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 6. ed. [S. l.]: Elsevier, 2015.

RIGAMONTI, Elena *et al.* Macrophage Plasticity in Skeletal Muscle Repair. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 9, 2014.

ROCCISANO, Dante *et al.* Dietary Fats and Oils: Some Evolutionary and Historical Perspectives Concerning Edible Lipids for Human Consumption. **Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 689–702, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1039/c9fo01353a>

ROMER, Alfred Sherwood; PARSONS, Thomas S. **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. São Paulo: Editora Atheneu, 1985.

ROSS, Jacob A *et al.* SIRT1 regulates nuclear number and domain size in skeletal muscle fibers. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, p. 7157–7163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.26542>

RUPPERT, Edward E; FOX, Richard S; BARNES, Robert D. **Zoologia dos Invertebrados, uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Editora Rocca, 2005.

SABLE, P. S. *et al.* Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. **Neuroscience**, [s. l.], v. 217, p. 46–55, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.001>

SABOROWSKI, I.R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill *Meganyctiphanes norvegica* from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, [s. l.], v. 140, n. 3, p. 557–565, 2002.

SANIOTIS, Arthur; HENNEBERG, Maciej. Evolutionary Medicine and Future of Humanity: Will Evolution Have the Final Word? **Humanities**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 278–291, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/h2020278>

SCHIAFFINO, Stefano *et al.* Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 280, n. 17, p. 4294–4314, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.12253>

SCHIAFFINO, Stefano; REGGIANI, Carlo. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>

SCHIAFFINO, Stefano; SANDRI, Marco; MURGIA, Marta. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. **Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 269–278, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2007>

SCHMELZER, Kara *et al.* **The Lipid Maps Initiative in Lipidomics**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)32007-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)32007-7)

SCOTT, Wayne *et al.* Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. **Physical Therapy**, [s. l.], v. 81, n. 11, p. 1810–1816, 2001.

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 25, n. C, p. 192–205, 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

SEIPEL, Katja; SCHMID, Volker. Evolution of striated muscle: Jellyfish and the origin of triploblasty. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 282, n. 1, p. 14–26, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.032>

SHAHJAHAN, Md. Skeletal muscle development in vertebrate animals. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 139–148, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v1i2.25592>

- SHRESTHA, Nirajan *et al.* Developmental programming of peripheral diseases in offspring exposed to maternal obesity during pregnancy. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 319, n. 31, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00214.2020>
- SHRESTHA, Nirajan *et al.* Role of omega-6 and omega-3 fatty acids in fetal programming. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 907–915, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13244>
- SILVA, Adriana R.; MORAES, Bianca P.T.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano F. Mediterranean diet: Lipids, inflammation, and malaria infection. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1–22, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21124489>
- SIMOPOULOS, A P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–17, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- SIMOPOULOS, A P. Human Requirement for N-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Poultry Science**, [s. l.], v. 79, p. 961–970, 2000.
- SIMOPOULOS, A P. Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: Evolutionary aspects of diet. **World Review of Nutrition and Dietetics**, [s. l.], v. 102, p. 10–21, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000327785>
- SIMOPOULOS, A P. Omega-6 and omega-3 fatty acids: Endocannabinoids, genetics and obesity. **Ocl**, [s. l.], v. 27, p. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/ocl/2019046>
- SIMOPOULOS, A P. The importance of the ratio of omega-6 / omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, [s. l.], v. 56, p. 365–379, 2002.
- SIMOPOULOS, A P; DINICOLANTONIO, J J. The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. **Open Heart**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000385>
- ŚLESIAK, Ireneusz *et al.* Enzymatic Antioxidant Systems in Early Anaerobes: Theoretical Considerations. **Astrobiology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 348–358, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1328>
- SNIJDERS, Tim *et al.* Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–21, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00283>
- SOUZA, Daniel Santos; MEDRADO, Leandro; GITIRANA, Lycia de Brito. Histologia. *In*: CONCEITOS E MÉTODOS PARA A FORMAÇÃO DE PROFISSIONAIS EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE. 4. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2008. p. 43–88.
- SPENCE, Alexandre P. **Anatomia Humana Básica**. 2. ed. São Paulo: Editora Manole, 1991.
- SRERE, P A. Citrate synthase. *In*: METHODS IN ENZIMOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 1969. p. 3–11. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(69\)13005-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(69)13005-0)
- STUERMER, Ewa K. *et al.* Musculoskeletal response to whole-body vibration during

fracture healing in intact and ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 168–180, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9381-0>

SUI, N. *et al.* Increase in unsaturated fatty acids in membrane lipids of Suaeda salsa L. enhances protection of photosystem II under high salinity. **Photosynthetica**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 623–629, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0080-x>

SVEGLIATI-BARONI, Gianluca *et al.* Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 144, n. February, p. 293–309, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029>

TANG, Qi Qun; LANE, M. Daniel. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 81, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718>

TERMIN, A; STARON, R S; PETTE, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. **Histochemistry**, [s. l.], v. 92, n. 6, p. 453–457, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00524756>

THUESEN, E.V.; MCCULLOUGH, K.D.; CHILDRESS, J.J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005.

TINTIGNAC, Lionel A; BRENNER, Hans Rudolf; RÜEGG, Markus A. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 809–852, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014>

TONG, Jun F *et al.* Maternal obesity downregulates myogenesis and beta-catenin signaling in fetal skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 296, p. 917–925, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90924.2008>.

TUMOVA, J; ANDEL, M; TRNKA, J. Excess of Free Fatty Acids as a Cause of Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle Skeletal. **Physiological Research**, [s. l.], v. 65, p. 193–207, 2016.

TURNER, Nigel *et al.* Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: Evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 2085–2092, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db07-0093>

TWINING, Cornelia *et al.* Conversion efficiency of α -linolenic acid to omega-3 highly unsaturated fatty acids in aerial insectivore chicks. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 221, n. 3, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.165373>

TWINING, Cornelia *et al.* The evolutionary ecology of fatty-acid variation: implications for consumer adaptation and diversification. **Authorea Preprints**, [s. l.], p. 1–31, 2020.

TYČ, François; SŁAWIŃSKA, Urszula; VRBOVÁ, Gerta. The age dependent effect of partial denervation of rat fast muscles on their activity. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 105–114, 1999.

URIHO, Angelo *et al.* Benefits of blended oil consumption over other sources of lipids on the cardiovascular system in obese rats. **Food and Function**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9fo01353a>

VENEGAS-CALERÓN, Mónica; SAYANOVA, Olga; NAPIER, Johnathan A. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 108–119, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.10.001>

VON MALTZAHN, Julia *et al.* Wnt signaling in myogenesis. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 602–609, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.008>

WALRAND, Stéphane. **Nutrition and skeletal muscle**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2016-0-00256-5>

WALTON, W J N. The anatomy and physiology of the motor unit. *In*: DISORDERS OF VOLUNTARY MUSCLE. 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

WANG, Ping *et al.* **The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.21386>

WEBER, George. Study and evaluation of regulation of enzyme activity and synthesis in mammalian liver. **Advances in Enzyme Regulation**, [s. l.], v. 1, n. C, p. 1–35, 1963. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(63\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0065-2571(63)90004-9)

WENDELL, A. Glutathione Peroxidase. *In*: METHODS IN ENZIMOLGY. [S. l.]: Elsevier, 1981. p. 325–333.

WESOŁOWSKI, Stephanie R. *et al.* Switching obese mothers to a healthy diet improves fetal hypoxemia, hepatic metabolites, and lipotoxicity in non-human primates. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 18, p. 25–41, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.09.008>

WHO. **World Health Organization**. [S. l.], 2020.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, Anna; BEREZINSKA, Malgorzata; NOWAK, Jerzy Z. PUFAs: Structures, metabolism and functions. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 931–941, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.17219/acem/31243>

WOLPERT, L *et al.* **Princípios da Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WOODS, Laura *et al.* Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00308-x>

WOSCZYNA, Michael N.; RANDO, Thomas A. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 135–143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>

WRÓBLEWSKI, Felix; GREGORY, Kenneth F. Lactic Dehydrogenase Isozymes and Their Distribution in Normal Tissues and Plasma and in Disease States. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 912–932, 1961. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1961.tb35584.x>

YAN, Xu *et al.* Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development. **Journal of Genomics**, [s. l.], v. 1, p. 29–38, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/jgen.3930>

ZAZULA, Matheus Felipe M.F. *et al.* Morphological effects of whole-body vibration on remobilization of the tibialis anterior muscle of *Wistar* rats. **Anatomical Record**, [s. l.], v. 303, n. 11, p. 2857–2864, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ar.24390>

ZHANG, Ronghua *et al.* The difference in nutrient intakes between Chinese and mediterranean, Japanese and american diets. **Nutrients**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 4661–4688, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7064661>

ZHAO, Po; HOFFMAN, Eric P. Embryonic Myogenesis Pathways in Muscle Regeneration. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 229, n. 2, p. 380–392, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dvdy.10457>

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1303

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO - UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.058064/2019-40

APROVADO/APPROVAL: 11/09/2019 – R.O. 08/2019

TÍTULO: Avaliação do efeito da Suplementação Crônica com Óleo de Peixe sobre o Desenvolvimento do Músculo Estriado Esquelético.

TITLE: Evaluation of the effect of Chronic Fish Oil Supplementation on the Development of Skeletal Striated Muscle.

AUTORES/AUTHORS: Katya Naliwaiko, Ana Tereza Bittencourt Guimarães, Matheus Felipe Zazula, Malu Cristina Montoro de Lima, Stephanie Rubianne Silva Carvalhal, Bruna Comotti de Oliveira.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI**, **MEDICO VETERINARIO**, em 17/10/2019, às 11:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAICO**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/08/2020, às 16:14, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2225463** e o código CRC **B014DE8D**.